



CENTRO DE INVESTIGACIÓN Y DE ESTUDIOS AVANZADOS DEL  
INSTITUTO POLITÉCNICO NACIONAL

UNIDAD ZACATENCO  
DEPARTAMENTO DE BIOMEDICINA MOLECULAR

**Participación de IL-10/IL-10R inducidos por la infección de  
*Salmonella* Typhimurium en la vía de señalización  
PI3K/Akt/mTORC1 en linfocitos B**

T E S I S

que presenta

ANA DANIELA GONZALEZ TELONA

Para obtener el Grado de

MAESTRA EN CIENCIAS

EN LA ESPECIALIDAD DE  
BIOMEDICINA MOLECULAR

Director de la Tesis:  
Dr. Vianney Francisco Ortiz Navarrete

## AGRADECIMIENTOS

Agradezco al CINVESTAV, al CONACyT, así como a los trabajadores del CINVESTAV quienes estuvieron apoyándome a lo largo de mi estancia de maestría; especialmente a “Chuchín”, a la Dra. Rosaura y a Maru, nuestra secretaria departamental, así como a mis compañeros de laboratorio.

Agradezco también al Dr. Vianney F. Ortiz Navarrete, quien fungió como mi asesor y tutor de tesis. Gracias por su enseñanza, apoyo y dedicación. Así, como al Dr. Santos, la Dra. Carmen y el Dr. Roberto.

## DEDICATORIA

Este trabajo se lo dedico a mi esposo, hermana, cuñado y padres quienes hasta en mis momentos más difíciles nunca dejaron de creer en mí. Los amo. Este trabajo también va para Luis Uriel y Diana quienes me han acompañado a lo largo de este viaje con sus abrazos, buenos ratos y risas, y por siempre haberme apoyado.

Finalmente, se lo dedico de todo corazón a Rogelio, gracias a quien todo esto fue posible.

•  
,

Semicolon-

Where the author could've ended the sentence but decided to keep going. The author is you and the sentence is your life.

## CONTENIDO

<a href="#">Resumen</a>	v
<a href="#">Abstract</a>	vi
<a href="#">Introducción</a>	1
1.1 <a href="#">Salmonella enterica serovar Typhimurium/Typhi</a>	1
1.2 <a href="#">Linfocitos B e infección por Salmonella Typhimurium</a>	2
1.3 <a href="#">IL-10 y el receptor de IL-10 (IL-10R)</a>	6
1.4 <a href="#">IL-10/IL-10R y linfocitos B</a>	9
<a href="#">Antecedentes directos</a>	11
<a href="#">Problema de investigación</a>	17
<a href="#">Justificación</a>	18
<a href="#">Hipótesis</a>	19
<a href="#">Objetivo general</a>	20
<a href="#">Objetivos particulares</a>	20
<a href="#">Materiales y métodos</a>	21
<a href="#">Resultados</a>	28
1.1 <a href="#">Generación de mutante Salmonella Typhimurium <math>\Delta</math>SarA</a>	
1.2 <a href="#">Salmonella Typhimurium induce la expresión de IL-10 y su receptor</a>	
1.3 <a href="#">La producción de IL-10 por los linfocitos B infectados promueve la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1</a>	
<a href="#">Discusión</a>	37
<a href="#">Conclusiones</a>	45
<a href="#">Perspectivas</a>	46
<a href="#">Bibliografía</a>	48

## RESUMEN

*Salmonella* sp. es una bacteria gram-negativa flagelada considerada como un patógeno importante en humanos. La ingesta de varios de los serovares provocan infecciones a nivel de intestino delgado, causando cuadros de gastroenteritis y en casos más reducidos, provocan una infección sistémica y fiebre entérica. En el ratón, es *Salmonella* Typhimurium el agente patológico responsable de producir una infección sistémica, proceso patológico parecido al observado en humanos a causa de *Salmonella* Typhi. *S. Typhimurium* no sólo es capaz de infectar y sobrevivir en macrófagos, se ha demostrado en diferentes estudios el papel de los linfocitos B como importantes células huésped para ésta. Tras infectarse por *Salmonella* Typhimurium, las células B comienzan a sufrir cambios debido a la translocación de efectores bacterianos. SopB y SarA juegan un papel fundamental en la activación de vías de señalización importantes para establecer y mantener la infección intracelular. Con base en esta información, ¿IL-10 inducido por *Salmonella* Typhimurium estaría participando en el encendido de la vía de señalización de PI3k/Akt/mTORC1 en células infectadas, así como en células B circundantes? De ser así, ¿cuál sería su efecto en la funcionalidad en los linfocitos B y el efecto biológico sobre la bacteria misma? Se hipotetiza que la interleucina 10 secretada por linfocitos infectados con *Salmonella* Typhimurium activa la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1 en los linfocitos B circundantes no infectados. Se determinó que *Salmonella* Typhimurium promueve la expresión de IL10R (subunidad  $\alpha$ ) e IL10, así como su secreción en linfocitos B primarios. Además de que se demostró que la infección intracelular por esta bacteria promueve la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1 en células circundantes. La participación de IL-10/IL-10R inducidos por la infección de *Salmonella* Typhimurium en la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1 en linfocitos B permite la generación de un nicho favorable para el establecimiento en la cronicidad de la infección por esta misma bacteria.

## ABSTRACT

*Salmonella* sp. is a flagellated gram-negative bacterium considered to be an important pathogen in humans. The ingestion of several of the serovars cause infections at the level of the small intestine, causing gastroenteritis and in smaller cases, causing a systemic infection and enteric fever. In mouse, *Salmonella* Typhimurium is the pathological agent responsible for producing an infection similar to the systemic pathological process observed in humans due to *Salmonella* Typhi. *S. Typhimurium* is not only capable of infecting and surviving in macrophages, the role of B lymphocytes as important host cells has been demonstrated in different studies. Upon infection by *Salmonella* Typhimurium, B cells begin to undergo changes due to the translocation of bacterial effectors. SopB and SarA play a critical role in activating signaling pathways important for the establishment and maintenance of an intracellular infection. Based on this information, would *Salmonella* Typhimurium induced IL-10 participates in the activation of the PI3k/Akt/mTORC1 signaling pathway in infected cells, as well as in surrounding B cells? If so, what would be its effect on functionality in B lymphocytes and the biological effect on the bacteria itself? Interleukin 10 secreted by *Salmonella* Typhimurium-affected lymphocytes is hypothesized to activate the PI3K/Akt/mTORC1 signaling pathway in non-infected surrounding B cells. It was determined that *Salmonella* Typhimurium promotes the expression of IL-10R ( $\alpha$  subunit) and IL-10, as well as its secretion in primary B lymphocytes. In addition, it is highlighted that intracellular infection by this bacterium promotes the activation of the PI3K/Akt/mTORC1 signaling pathway in adjacent cells. The participation of IL-10/IL-10R induced by *Salmonella* Typhimurium infection in the PI3K/Akt/mTORC1 signaling pathway in B lymphocytes allows the generation of a favorable niche for the establishment of chronic infection by this same bacterium.

## INTRODUCCIÓN

### 1.1 Salmonella enterica serovar Typhimurium/Typhi

*Salmonella* sp. es una bacteria gram negativa flagelada considerada como un patógeno importante en humanos y varias especies de importancia alimentaria (Mathur R., *et al.*, 2012). Esta bacteria es capaz de invadir células hospederas y crecer intracelularmente. Para lograr esto, ha desarrollado un sistema de proteínas especializadas conocidas como efectores bacterianos (Roppenser, B., Grinstein S., & Brumell J. H., 2012). En humanos, la ingesta por vía fecal-oral de varios de los serovares provoca infecciones a nivel de intestino delgado, conllevando al desarrollo de una gastroenteritis y en casos más reducidos, algunos de estos serovares pueden provocar una infección sistémica y fiebre entérica, también conocida como fiebre tifoidea (Mittrücker H. W. & Kaufmann S. H., 2000). Esta enfermedad, en humanos, es causada por *Salmonella enterica* serovar Typhi (*Salmonella* Typhi), la cual no causa una infección sistémica en los ratones. A nivel global, se reportan entre 16 a 20 millones de casos al año, resultando en aproximadamente 600 000 muertes (Kidgell C., *et al.*, 2002). En México, se reportaron un total de 41 553 casos para 2021, de los cuales 11 037 corresponden a pacientes de fiebre tifoidea (sem. 33, 2021 CIE-10 rev, boletín epidemiológico Secretaría de Salud).

El género *Salmonella* se compone de dos especies; *Salmonella bongori* y *Salmonella enterica*, que a su vez se han dividido según el antígeno O (somático) y el antígeno H (flagelar) en diversos serogrupos y serovares. En el caso particular de *S. Typhimurium* y *S. Typhi*, serovares con un 90% de similitud génica, aproximadamente, se expresan distintos factores de virulencia que los distinguen el uno del otro. Del 10% de los genes que difieren encontramos ciertos factores de virulencia que les confieren su respectivo potencial patogénico. Estos factores de virulencia son codificados dentro de las islas de patogenicidad de *Salmonella* o SPI por sus siglas en inglés. De estas islas, 11 se comparten entre ambos serovares, mientras que los SPIs-7, 15, 17 y 18 son específicos de *S. Typhi* y la SPI-14 de *S. Typhimurium*.

Las islas de patogenicidad 1 y 2 (SPI1 y SPI2) de *Salmonella* codifican 2 tipos de clústeres genéticos para sistemas de secreción de tipo III o T3SS, mecanismos de secreción que actúan como jeringa molecular (De Jong H. K., *et al.*, 2012). Éstos funcionan en tiempos diferentes durante la infección, el T3SS codificado por SPI1 se activa por contacto con la célula hospedero y transloca proteínas bacterianas a través de la membrana plasmática y juega un papel importante en la invasión de células no fagocíticas, además, induce inflamación y diarrea; el

T3SS de SPI2 se expresa dentro de los fagosomas y transloca efectores a través de la membrana vacuolar y tiene un papel importante en la supervivencia bacteriana en macrófagos y el establecimiento de la enfermedad sistémica (Haraga A., Ohlson M. B. & Miller S. I., 2008). Los efectores SopB, SopE y SopE2 activan a las Rho GTPasas Cd42, Rac1 y RhoG, las cuales, a su vez permiten la reorganización del citoesqueleto de actina, el plegamiento de la membrana y la internalización de la bacteria por macropinositosis (Haraga A., Ohlson M. B. & Miller S. I., 2008).

Se ha descrito en numerosos laboratorios de investigación que la infección en ratones por *S. Typhimurium*, causa una infección diseminada con alto grado de extrapolación con la tifoidea humana (Mathur R., *et al.*, 2012). Por ende, es el modelo de infección utilizado tanto en cultivo celular como en modelo animal. Esta bacteria tiene la capacidad de invadir los enterocitos no fagocíticos del epitelio intestinal mediante un mecanismo conocido como endocitosis mediada por bacterias (Haraga A., Ohlson M. B. & Miller S. I., 2008). Tras la ingesta y colonización en el intestino delgado, a través de su interacción con las células M, *S. Typhimurium* invade a las placas de Peyer, en donde invade los nódulos linfáticos mesentéricos, permitiendo así su dispersión. Los macrófagos, así como las células del sistema inmunitario adquirido, quienes, además, confieren una protección ante futuras reinfecciones, juegan un papel importante en la eliminación de este patógeno. Sin embargo, la infección puede persistir durante varios días debido a la capacidad que tiene esta bacteria de infectar de manera intracelular a las células inmunitarias (Mittrücker H. W. & Kaufmann S. H., 2000).

Se ha descrito que la infección por *Salmonella* activa la respuesta celular, activándose los linfocitos T CD4+ y T CD8+, además de la generación de anticuerpos y una protección mediada por linfocitos B (Mittrücker H. W. & Kaufmann S. H., 2000). La interacción de los patrones moleculares asociados a patógeno (PAMPs) de *Salmonella* con los receptores tipo toll (TLRs) y los receptores tipo NOD (NLRs) deriva en la formación del inflamasoma, la activación y reclutamiento de neutrófilos y macrófagos, así como la producción de citocinas proinflamatorias; como la interleucina 6 (IL-6), el factor de necrosis tumoral (TNF- $\alpha$ ), IL-1 $\beta$  e interferón-gamma (IFN- $\gamma$ ) (De Jong H. K., *et al.*, 2012).

## 1.2 Linfocitos B e infección por *Salmonella Typhimurium*

Los linfocitos B se caracterizan por ser células presentadoras de antígenos responsables de la producción de anticuerpos, además, se han asociado importantemente a la producción de citocinas y por ende a la regulación de la respuesta inmunitaria (Neves P., *et al.*, 2010; Shen P., *et al.*, 2014). Las células B se pueden clasificar en dos subpoblaciones; los linfocitos B1 y los B2. Las células B1 corresponden aproximadamente a un 5% de las células B, se localizan preferentemente en cavidades serosas, como el peritoneo, donde constituyen hasta el 50% o más de las células B presentes en dicha cavidad. Se trata de unas células con semejanza a células efectoras innatas, en ratón, son fuente de anticuerpos IgM y participan en la protección contra bacterias encapsuladas. A partir de la expresión de la molécula CD5, se distinguen dos subpoblaciones: las B1a (CD5+) y las B1b (CD5-). Las células B2 son la población más abundante de células B en los ratones adultos, incluyen a las subpoblaciones de zona marginal (MZ) y foliculares (FO). Las MZ se localizan en los márgenes de los folículos esplénicos y responden contra patógenos presentes en la sangre; mientras que las FO se encuentran en bazo y ganglios linfáticos y participan en la respuesta inmune adaptativa. Adicionalmente, los linfocitos B juegan un papel importante en la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-35 y permiten a ciertas especies de bacterias sobrevivir y llevar a cabo la progresión de la infección (García-Gil A., Lopez-Bailon L. U. & Ortiz-Navarrete V., 2019).

*S. Typhimurium* no sólo es capaz de infectar y sobrevivir en macrófagos, recientemente se han llevado a cabo diferentes estudios en los cuales se demuestra el papel de los linfocitos B como importantes células huésped para este tipo bacteriano. Como se mencionó anteriormente, los linfocitos B producen citocinas y actúan como APCs importantes para la activación de los linfocitos T. Sin embargo, se ha reportado que algunos patógenos como *Salmonella*, *Brucella*, *Listeria*, entre otros han evolucionado y perfeccionado mecanismos como la inducción de la macropinositosis, la expresión de moléculas inhibitorias, la inducción de la apoptosis, la secreción de citocinas anti-inflamatorias o la desregulación del inflamasoma con el fin de manipular la respuesta inmunológica mediada por las células B (García-Gil A., Lopez-Bailon L. U. & Ortiz-Navarrete V., 2019).

Se ha descrito la capacidad de *S. Typhimurium* de promover su entrada en linfocitos B de bazo de ratón, mediante un proceso dependiente de los genes SPI-1. Una vez que *Salmonella* logra establecerse de manera intracelular, la célula B procesa los péptidos bacterianos y es capaz de activar, mediante presentación por moléculas clase I del complejo principal de histocompatibilidad, a los linfocitos T CD8+, promoviendo su actividad citotóxica. Esta

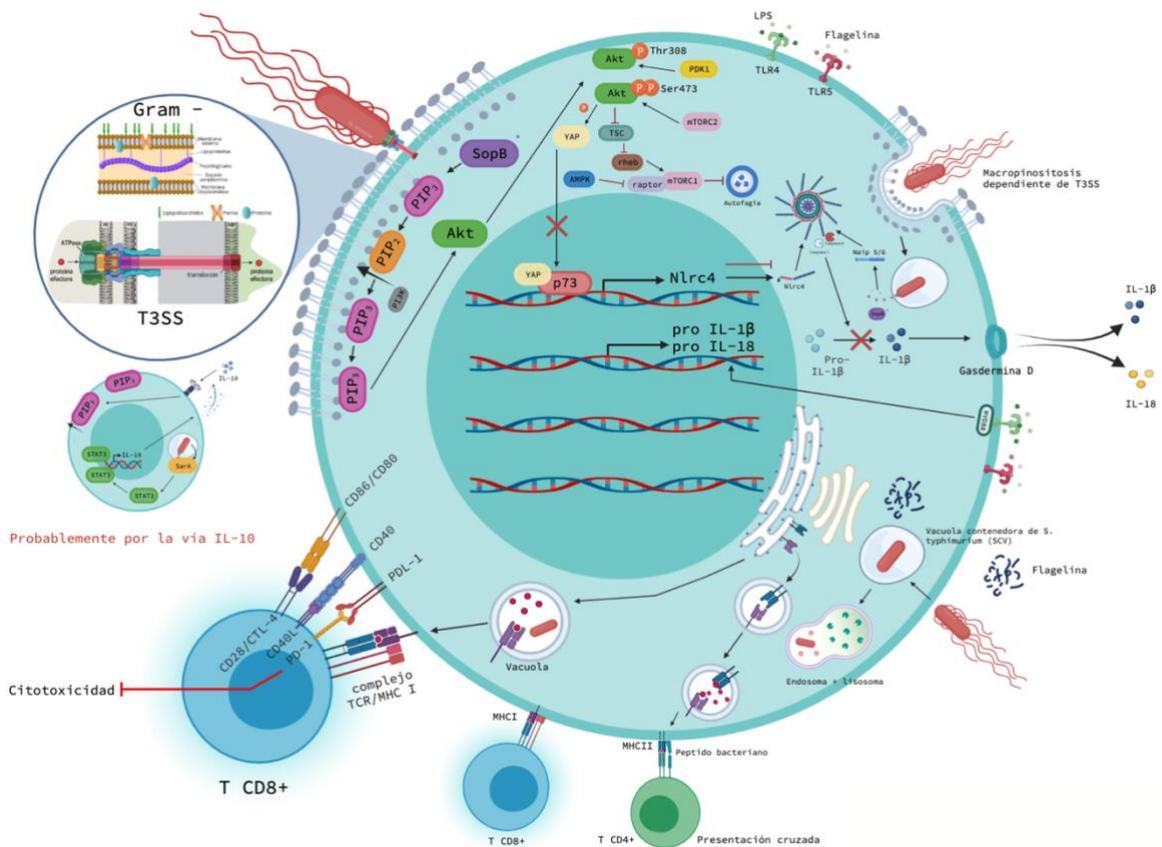
bacteria es capaz de inducir su entrada a la célula gracias al rearrreglo de las redes de actina y microtúbulos. Se ha demostrado que es necesaria la participación de SPI-1 para que pueda llevarse a cabo la invasión de células B y que, además, como consecuencia, sucede la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt (Rosales-Reyes R., *et al.*, 2012) (Figura 1). Los macrófagos activados por IFN- $\gamma$  utilizan un mecanismo alternativo para presentar antígenos de *Salmonella* a los linfocitos T CD8+. Este mecanismo alterno involucra el procesamiento del antígeno dentro de una vacuola, seguido de la secreción y carga del péptido antigénico a la superficie celular por el complejo principal de histocompatibilidad de tipo I. Rosales-Reyes R., *et al.*, demostraron en 2005 que este proceso no sucede en linfocitos B, pero que sí sucede la formación de un compartimento de tipo lisosomal-endosomal diferente al que se ha descrito en macrófagos (Rosales-Reyes R., *et al.*, 2005). La formación de vacuolas contenedoras de *Salmonella* (SCV), cuyas características se asemejan a los compartimentos lisosomal-endosomal tardíos, permiten a la bacteria una mejor supervivencia en los linfocitos B, en comparación con los macrófagos. La carencia de la remodelación de estas vacuolas le permite a la bacteria albergarse de manera intracelular, confiriéndole una ventaja de supervivencia (Rosales-Reyes R., *et al.*, 2005) (Figura 1).

Se han descrito diversos mecanismos que le confieren a *Salmonella* la capacidad de sobrevivir e infectar de manera intracelular a los linfocitos B. Perez-Lopez A., *et al.*, demostraron que la flagelina y LPS sintetizados por *Salmonella*, a través de la activación del TLR5 y TLR4, respectivamente, son capaces de promover la expresión de pro-IL-1 $\beta$ . Sin embargo, las células B de ratón infectadas con *Salmonella* no son capaces de escindir a pro-IL-1  $\beta$  a su forma madura. Ello como consecuencia de que la bacteria introduce el efector SopB al citosol del linfocito B. También conocido como SigD, SopB está involucrada en la invasión y activación de la vía de señalización PI3K/Akt (De Jong H. K., *et al.*, 2012), así como la inhibición del proceso de apoptosis en las células epiteliales infectadas (Roppenser, B., Grinstein S., & Brumell J. H., 2012).

SopB se transloca a la célula hospedera y actúa como fosfatasa de fosfoinosítidos (PI), modulando directamente el metabolismo de éstos. Esta molécula actúa, específicamente, hidrolizando a PI(3,4)P<sub>2</sub>, PI(3,5)P<sub>2</sub> y PI(3,4,5)P<sub>3</sub> y algunos otros polifosfatos inositoles (Roppenser, B., Grinstein S., & Brumell J. H., 2012). La activación canónica de la serina/treonina proteína cinasa B (Akt) ocurre tras la estimulación de diversos receptores con capacidad de activación de la fosfatidilinositol 3 cinasa (PI3K), quien a su vez conlleva a la

producción de PI(3,4)P<sub>2</sub> y PI(3,4,5)P<sub>3</sub> y reclutamiento de Akt (Roppenser, B., Grinstein S., & Brumell J. H., 2012). Este efector bacteriano, tras activar esta vía de señalización, provoca una regulación a la baja de NLRC4 y por consiguiente la secreción de IL-1 $\beta$  (Figura 1). En particular, Akt, fosforila al factor de transcripción YAP, lo que permite mantenerlo secuestrado en el citoplasma, impidiendo su translocación al núcleo, evitando la formación del heterodímero YAP/p73, indispensable para la transcripción del gen que codifica para NLRC4. Sin la activación del inflammasoma NLRC4, la molécula pro-IL-1 $\beta$  no puede ser escindida por la caspasa 1 y por ende IL-1 $\beta$  no puede ser secretada. Como consecuencia de este proceso se evita la muerte por piroptosis de las células infectadas (Figura 1). Así, esta cadena de desregulación molecular y transcripcional evita el control eficaz contra la bacteria (Perez-Lopez, *et al.*, 2013, Abraham García-Gil, *et al.*, 2018).

Otro de los mecanismos participantes en la desregulación de la activación de los linfocitos T CD8<sup>+</sup> y generación de linfocitos B propicios para el establecimiento y mantenimiento de la infección persistente por *Salmonella* es la sobreexpresión de moléculas inhibitoras como PD-L1. López-Medina *et al.*, evaluaron la expresión de PD-1 en los linfocitos citotóxicos y el ligando PD-1 (PD-L1) en las células B infectadas. Se demostró que en éstas se lleva a cabo el procesamiento cruzado de los antígenos bacterianos, el cual involucra la degradación proteosomal y posterior presentación por moléculas del MHC I y II. Durante la infección aguda, las células infectadas expresan moléculas co-estimuladoras como CD40, CD80 y CD86, así como moléculas inhibitoras como PD-L1 y PD-L2. Estas últimas se expresan de manera importante durante la infección crónica por esta bacteria. De tal manera, la interacción entre PD-1 y PD-L1 estaría implicada en la regulación negativa de la respuesta citotóxica contra células infectadas por *Salmonella*, confiriéndole a la bacteria un mayor tiempo de vida dentro de las células infectadas (López-Medina, *et al.*, 2015) (Figura 1).



**Fig. 1 Esquema integrativo de los procesos inmunológicos y moleculares descritos en linfocitos B infectados por *Salmonella enterica* serovar *Typhimurium*.** *Salmonella* es capaz de actuar de manera extracelular e intracelular. Mediante un mecanismo dependiente de T3SS, es capaz de inducir su entrada a las células no fagocíticas mediante macropinositosis. Dentro de la célula se forman vacuolas contenedoras de *Salmonella* (SCV), que permiten a la bacteria translocar efectores bacterianos que le confieren la capacidad de mantener un ambiente favorable para la persistencia de la infección.

### 1.3 IL-10 y el receptor de IL-10 (IL-10R)

La interleucina 10 (IL-10) es una citocina anti-inflamatoria con importantes funciones inmunomoduladoras; es secretada principalmente por células dendríticas, linfocitos T, monocitos, células B y macrófagos. En su forma biológicamente funcional existe como homodímero y se une al heterodímero tetramérico del receptor de IL-10 (Verma R., *et al.*, 2016). Es una citocina supresora de la proliferación de las células T (Akdis C. A., *et al.*, 2000) y juega un papel importante en la regulación de la tolerancia a patógenos exógenos. IL-10 actúa en diversos estadios de la respuesta inmunológica y ha sido caracterizada como una citocina tipo T “helper” 2 (TH2) (Saraiva M. & O ‘garra A., 2010). Inicialmente fue descrita como factor inhibidor de la síntesis de citocinas o CSIF, por sus siglas en inglés. Es capaz de inhibir la producción de citocinas pro-inflamatorias como IL-1 $\beta$ , IL-6, entre otros y de disminuir la expresión de las moléculas de MHC II, así como moléculas co-estimuladoras (CD80, CD83 y CD86) en células presentadoras de antígenos (Shülke S., 2018). Además de su papel en la

regulación de la respuesta inflamatoria, está asociada a la regulación de la diferenciación y crecimiento de células B, NK, células T cooperadoras y citotóxicas, células dendríticas (DCs), entre otras (Moore K. W., *et al.*, 2001). Su transcripción está regulada por los factores de transcripción Sp1 y Sp3, los cuales se expresan de manera constitutiva en diversos tipos celulares (Moore K. W., *et al.*, 2001).

IL-10 ha sido caracterizado como un elemento importante en la persistencia de patógenos intracelulares *in vivo* como *Leshmania donovani*, *Mycobacterium tuberculosis* y *Trypanosoma cruzi* (Verma R., *et al.*, 2016). La secreción de IL-10 inducida por bacterias promueve la inhibición de una respuesta inflamatoria exacerbada y actúa como mecanismo de defensa para la bacteria, inhibiendo la respuesta inmunológica del huésped contra ésta (Han X., *et al.*, 2006). La estimulación de las células B con ligandos de TLR4 y TLR9 conduce a la producción de IL-10 (O' Garra A., *et al.*, 1992; Heine G., *et al.*, 2008), lo cual a su vez está asociado a una alta expresión y producción de IL-10 por la estimulación de macrófagos y células dendríticas mieloides. Al activarse los TLRs, se recluta a MYD88, promoviendo la activación de las proteínas cinasas activadas por mitógenos (MAPKs) y el factor nuclear  $\kappa$ B (NF- $\kappa$ B) (Saraiva M. & O'garra A., 2010). Se ha descrito un fenómeno de resistencia a la infección en el caso de *Salmonella Choleraesuis* en un ambiente en donde existe disminución de la interleucina IL-10 (Arai T., *et al.*, 1995).

El receptor de IL-10 (IL-10R) posee una alta afinidad de unión con su ligando y tiene la capacidad de promover la proliferación de células pro-B en respuesta a IL-10 de ratón. La secuencia de este receptor contiene un marco de lectura abierto de 576 aminoácidos y posee una masa molecular de aproximadamente 63 kDa. Forma parte de la superfamilia de receptores de citocinas de clase I, conformados por 4 $\alpha$  hélices, dentro de la cual la mayoría de sus receptores carecen de 2 motifs de cisteínas conservadas y se asemeja estructuralmente a los receptores de clase II, en donde hallamos a los IFNRs (Ho A. S., *et al.*, 1993). El receptor de IL-10 está compuesto por cuatro subunidades. La primera subunidad homodimérica conocida como IL-10R1 o  $\alpha$  tiene la capacidad de unirse tanto a IL-10 de ratón como de humano y corresponde a la subunidad de unión específica a ligando (Moore K. W., *et al.*, 2001). Se expresa en la mayoría de las células hematopoyéticas y mayoritariamente su expresión es inducible y no constitutiva. Por otro lado, la subunidad constituida por dos monómeros de IL-10R2 o  $\beta$  es necesaria para que se lleve a cabo la transducción de señales y se expresa de manera constitutiva en la mayoría de las células (Burmeister A. R. & Marriott I., 2018). Se ha descrito

la presencia del mRNA de IL-10R en diversas líneas celulares, como macrófagos, timocitos, linfocitos B estimulados y, aunque en menor cantidad en células B no estimuladas (Ho A. S., *et al.*, 1993).

Actualmente se conocen numerosas citocinas relacionadas a IL-10 (Donnelly R. P., *et al.*, 2004). Estas citocinas incluyen a IL-22, IL-26 y a IFN- $\lambda$  (IFN- $\lambda$ 1; IL-29, IFN- $\lambda$ 2; IL-28A e IFN- $\lambda$ 3; IL-28B). Estas proteínas tienen en común el uso de la cadena IL-10R2. En el caso específico de IL-10, además de unirse a esta última cadena, necesita de la subunidad 1 o IL-10R1, a diferencia de los demás ligandos de la misma familia, los cuales requieren, para cada caso, de una cadena del receptor ligando específico (Donnelly R. P., *et al.*, 2004). Donnelly R.P. *et al.*, demostraron que IL-10, a través de la subunidad de IL-10R2, induce la activación de la vía de señalización JAK-STAT, tras la unión a su ligando mediante la subunidad  $\alpha$ . La familia de las proteínas JAK-STAT se constituye de cuatro tirosin cinasas Janus (JAK1-3 y TIK-2) y siete factores de transcripción citosólicos (STAT1-6). Dicho esto, esta citocina es capaz de activar a STAT1, STAT3 y en algunas células, como las pro-Bs, a STAT5 (Donnelly R. P., *et al.*, 2004). Adicionalmente, el homodímero de IL-10 tras unirse a su receptor activa a PI3K/Akt, además de estar involucrada en la supervivencia celular, sobrevida y actividades anti-apoptóticas (Verma R., *et al.*, 2016) (Figura 2).

Se ha demostrado que para que se pueda llevar a cabo la activación de las vías de señalización río abajo de IL-10R es fundamental la participación de 2 residuos de tirosinas ubicadas en el dominio intracelular del receptor 1 de IL-10; Tyr 427 y Tyr 477. Sin la participación de estos residuos se observó la ausencia de la activación de STAT3 (Weber-Nordt R. M., *et al.*, 1996). Adicionalmente, se reportó que la activación de las subunidades  $\alpha$  de IL-10R sucedía importantemente debido a la fosforilación de los residuos de tirosina 446 y 496, lo cual permite la activación de vías de señalización importantes en la regulación de la expresión de citocinas pro-inflamatorias, eventos anti-apoptóticos, entre otros (Verma R., *et al.*, 2016).

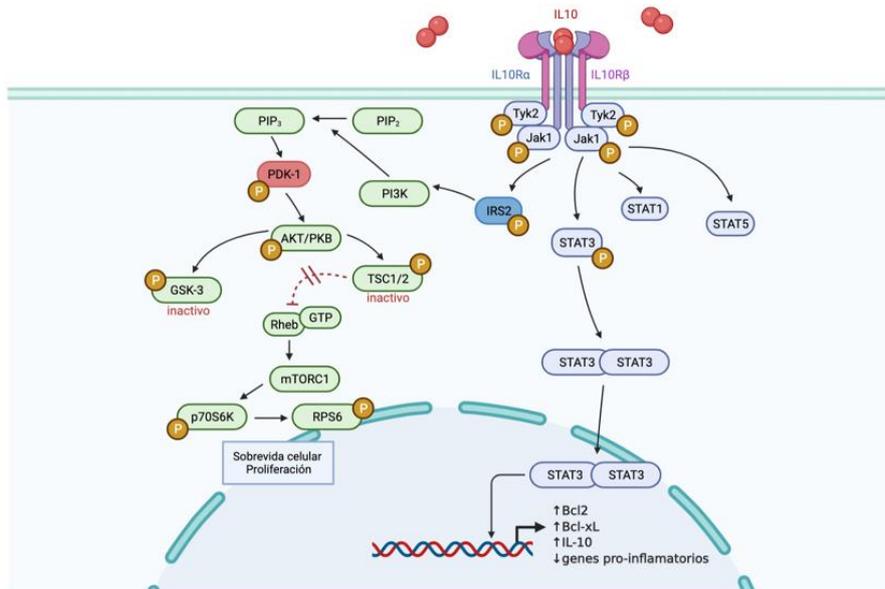


Fig. 2 Vías de señalización río debajo de la activación de IL-10R por la citocina IL-10. La molécula homodimérica de IL-10 señaliza a través de la activación del receptor heterotetramérico IL-10R. Se activan miembros de la familia de proteínas tirosin cinasas Janus (Jak), permitiendo la posterior activación por fosforilación de factores de transcripción como STAT3, STAT1 y STAT5, activándose las vías de señalización Jak/STAT. Además, se activa las vía de señalización PI3K/Akt. El encendido de estas vías tiene efectos antiinflamatorios e inmunosupresores, así como efectos en la sobrevida y proliferación celular. (Modificado de *IL-10 Cytokine Family Signaling Pathway*, 2014).

#### 1.4 IL-10/IL-10R y linfocitos B

Se ha demostrado en estudios *in vitro* como *in vivo* que la señalización de IL-10R juega un papel importante en el desarrollo de las células B, así, la presencia de IL-10 promueve la síntesis de DNA y la expansión de linfocitos B activados, así como su diferenciación hacia células plasmáticas (Cai G., *et al.*, 2012). Esta citocina tiene una capacidad proliferativa sobre los linfocitos B activados mediante CD40 y tiene un impacto importante en la estimulación de la producción de IgM, IgG e IgA (Rousset F., *et al.*, 1992).

Se ha descrito que los linfocitos B expresan al receptor de IL-10 desde la etapa prenatal en humanos (Schultz C., *et al.*, 2007). Por otro lado, existen reportes en donde se describe y fenotípica claramente la existencia de subpoblaciones de linfocitos B importantes en la producción de IL-10. Se ha propuesto a las células productoras de IL-10 CD1d<sup>high</sup>CD5<sup>+</sup> como una fuente celular de alta producción de esta citocina (Yanaba K., *et al.*, 2009). Esta producción de IL-10 es inducible y se refleja en la expresión de IL-10 citoplasmático. Estímulos como LPS unido a TLR4, son capaces de actuar como promotores de la activación de los linfocitos B10.

Se evidencio experimentalmente por Jurlander J., *et al.*, que las células B de pacientes con leucemia linfocítica crónica presentan una alta expresión de IL-10, lo que favorece, mediante su unión a IL-10R, la diferenciación de estas células y la inhibición de su proliferación (sin promover la apoptosis celular). Esto debido a que, como en células B normales, la interacción del receptor-ligando, resulta en la fosforilación de moléculas transductoras de señal como STAT1 y STAT3 (Jurander J., et al., 1997), permitiendo la formación de complejos de unión al DNA que participan en la transcripción de genes involucrados en la sobrevida y proliferación celular como Bcl-2 y VEGF (Weber-Nordt R. M., *et al.*, 1996) (Figura 2).

## ANTECEDENTES DIRECTOS

Tras infectarse por *Salmonella* Typhimurium, las células B comienzan a sufrir cambios debido a la liberación de efectores bacterianos producidos por *Salmonella*. Efectores como SopB y SarA juegan un papel fundamental en la activación de vías de señalización importantes para un mantenimiento eficaz de la infección intracelular.

Una de las razones que favorecen la sobrevivencia de *Salmonella* dentro de las células B es debido a la disminución de la expresión de NLRC4 y por ende a la ausencia de la formación del complejo del inflamasoma, lo que a su vez disminuye la maduración de pro-IL-1 $\beta$  y por ende la secreción de la molécula ya madura. Específicamente, es necesaria la fosforilación de YAP para que suceda este proceso durante la infección por *Salmonella* (Perez-Lopez, *et al.*, 2013, Abraham García-Gil, *et al.*, 2018).

En este sentido, un hallazgo importante fue descrito por Araceli Perez-Lopez *et al.* en 2013. Se demostró que los niveles de expresión de mRNA de NLRC4 sufren una disminución significativa a través del tiempo post-infección, fenómeno que no se observó solamente en los linfocitos infectados intracelularmente con *Salmonella* Typhimurium, sino que también en los linfocitos B circundantes, representados como la población GFP- (Figura 3). Esto estaría indicando que la bacteria mediante algún mecanismo extracelular está participando en la disminución de la expresión de NLRC4 de la misma manera que en los linfocitos B infectados.

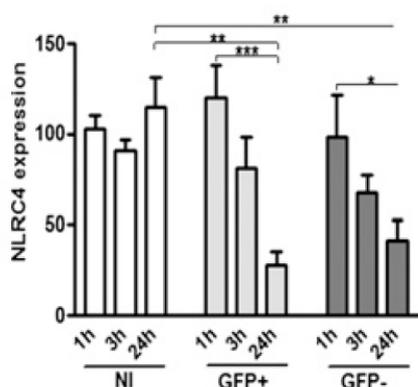


Fig. 3 Los niveles de mRNA de NLRC4 disminuyen en linfocitos B infectados y no infectados. Linfocitos B primarios fueron infectados con *Salmonella* Typhimurium GFP+ a una MOI de 50. Se llevó a cabo la purificación de los linfocitos B mediante selección negativa por columna y posteriormente por citometría de flujo para obtener a las células B GFP+/infectadas intracelularmente por la bacteria o las GFP-/no infectadas pero que estuvieron en contacto con *Salmonella* 1, 3 o 24 horas

antes de la evaluación de los niveles de NLRC4, sin que ocurra la fagocitosis de la bacteria. Los niveles de RNA totales fueron obtenidos mediante RT-PCR (Tomado de Perez -Lopez, A., *et al.*, 2013).

Adicionalmente, García-Gil A., *et al.*, demostraron en 2018 que el efector bacteriano de *Salmonella* SopB es la molécula responsable de activar la vía de señalización PI3K/Akt-YAP. SopB promueve la acumulación de PI(3,4)P<sub>2</sub>/PI(3,4,5)P<sub>3</sub> en la membrana celular lo que promueve el reclutamiento de Akt, de PDK1 y de mTORC2, quienes fosforilan a Akt en los residuos de treonina 308 y serina 473, respectivamente. En concordancia con los resultados de Perez-Lopez *et al.*, la acumulación de PIP3 se observó no solamente en las células B infectadas (GFP+) sino también en linfocitos B circundantes (GFP-) (Figura 4). Estos resultados sugieren que probablemente esté sucediendo una activación de la vía de señalización de PI3K/Akt a través de un factor soluble sobre los linfocitos B no infectados.

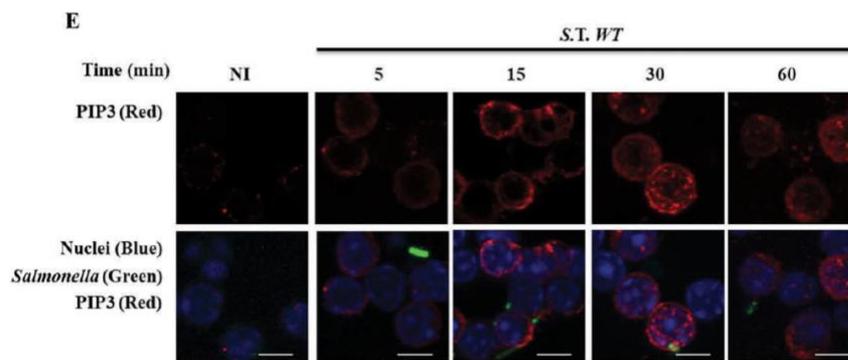
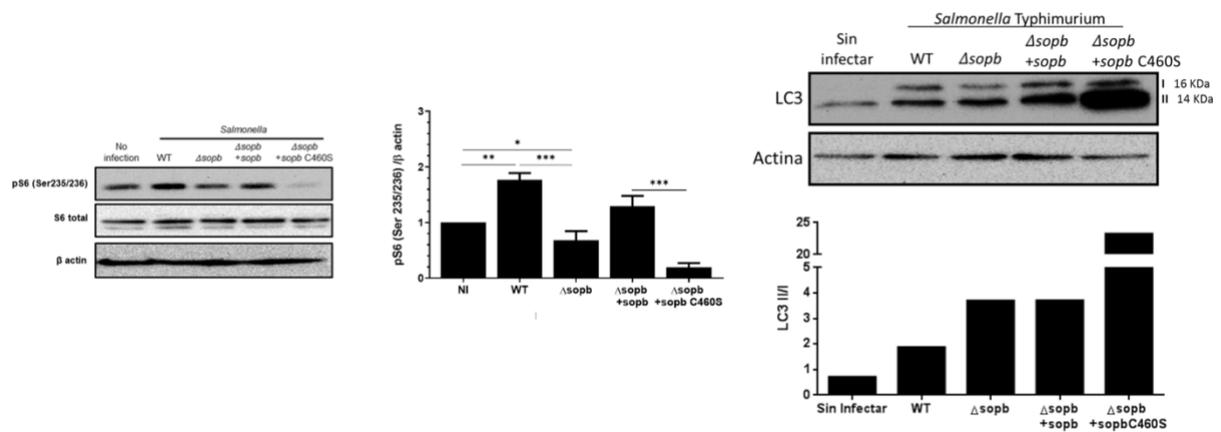


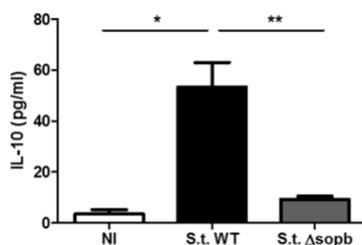
Fig. 4 **Acumulación de PIP3 en células B infectadas con *Salmonella Typhimurium***. Representación de una inmunotinción por microscopía confocal de PIP3 (rojo) en células B de ratones BALB/c infectados con *Salmonella Typhimurium* GFP+ (bacterias en verde) a una MOI de 50, evaluado en los tiempos indicados post-infección; núcleos celulares teñidos de azul (DAPI) (Tomado de García-Gil A., *et al.*, 2018).

Una consecuencia de la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt es la activación de mTORC1. Así, se ha determinado indirectamente mediante la fosforilación de la proteína S6 que mTORC1 está actuando como regulador negativo del proceso de autofagia, reflejado en la ausencia del proceso, favoreciendo la supervivencia de *Salmonella* (L. U., López Bailón, 2022). Se demostró que durante la infección por esta bacteria en células B se lleva a cabo la activación de Akt a través de la fosforilación en su serina 473. La fosforilación de la proteína S6 es consecuencia de la activación del complejo de mTORC1. Uno de los efectos de la activación de este complejo es la fosforilación de ULK1 en su serina 757, que a su vez es indispensable para evitar el fenómeno de autofagia. Todo esto mediado por la función de fosfatasa de SopB. La inhibición de la autofagia se corroboró a través de la evaluación de LC3 I/II (Figura 5).



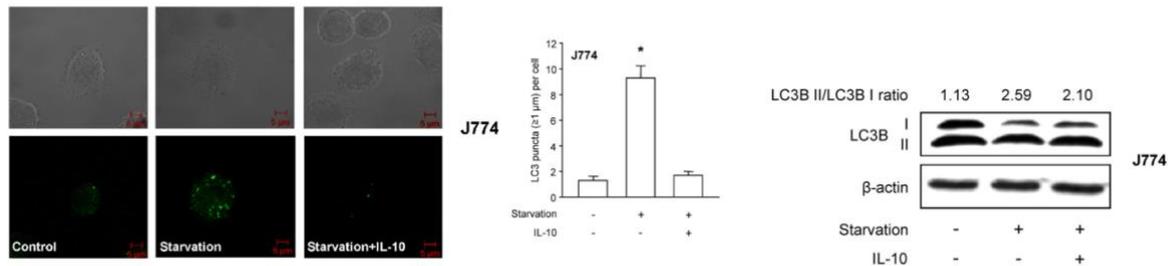
**Fig. 5 *Salmonella Typhimurium*, a través del efector bacteriano SopB, inhibe la autofagia.** La activación de mTORC1 se evaluó a través de los niveles de S6 fosforilado (S235/S236) en linfocitos B primarios infectados a una MOI de 50 con *Salmonella Typhimurium* WT,  $\Delta$ sopB, así como con una cepa mutante reconstituida con SopB ( $\Delta$ SopB+sopb) y una cepa carente de su función de fosfatasa de fosfoinositidos ( $\Delta$ SopB+sopb C460S) a las 3 horas post-infección mediante Western Blot y cuantificación por densitometría (gráfica). Se evaluaron los niveles de LC3 II/I en células B infectadas con las mismas cepas antes descritas (Modificado de Lopez-Bailon L., *et al.*, *Cells* 11.13 2022).

Otros investigadores han observado que *Salmonella* es capaz de promover la producción de IL-10, favoreciendo la generación de tolerancia inmunológica y afectando la eliminación del patógeno, por ende, la promoción de la diseminación sistémica infecciosa (Neves P., *et al.*, 2010). Abraham García-Gil, *et al.*, demostraron que la secreción de IL-10 en los linfocitos B infectados depende del efector bacteriano SopB, ya que las células infectadas con la bacteria mutante pierden la capacidad de secretar esta citocina (Abraham García-Gil, *et al.*, 2018) (Figura 6).



**Fig. 6 SopB regula la secreción de la citocina anti-inflamatoria IL-10.** Se infectaron linfocitos B con *Salmonella Typhimurium* WT (silvestre) o  $\Delta$ sopB a una MOI de 50. 24 horas post-infección se recuperaron los sobrenadantes y se determinó la concentración de IL-10 mediante ensayos de ELISA (Tomando de Abraham García-Gil, *et al.*, 2018/Figura suplementaria S4(a)).

Así mismo, se ha descrito en macrófagos (J774) el papel de IL-10 en la inhibición de la autofagia. Se demostró que en presencia de esta citocina no se lleva a cabo el proceso de autofagia inducida por inanición en esa estirpe celular. La razón LC3 II/I en los cultivos extenuados y tratados con IL-10 indican, de manera proporcional, la disminución en la formación de los autofagosomas (Figura 7).



**Fig. 7 IL-10 participa en la inhibición de la autofagia inducida por inanición en macrófagos.** Se trató con IL-10 (100 ng/mL) a la línea celular de macrófagos J774 y se indujo inanición de aminoácidos y suero durante 2 horas. De izquierda a derecha; se tomaron las células y analizaron por microscopía confocal (LC3 marcado en verde). Se cuantificaron los niveles de LC3 por célula en presencia o ausencia de IL-10 y en inanición o no. Se obtuvieron los lisados celulares y calculó el ratio LC3 II/I en las condiciones antes descritas mediante Western Blot (Modificado de Park H., *et al.*, Mol immunol. 2011).

Al unirse IL-10 a su receptor IL-10R $\alpha$  y la subsecuente activación de la subunidad IL-10R $\beta$ , se activan diversas vías de señalización importantes en la proliferación celular y supervivencia, además de que se permite la translocación de factores de transcripción al núcleo, permitiéndoles llevar a cabo su función transcripcional. Dicho esto, al activarse este complejo ligando-receptor, se activa, por un lado, la vía de señalización de Jak/STAT y por otro la vía de PI3K/Akt. De manera específica, se sabe que tras la activación del complejo IL-10/IL-10R se promueve el reclutamiento de la molécula Jak1 a la subunidad  $\alpha$  del receptor en donde va a ser fosforilada, lo que resulta en la fosforilación de la molécula STAT3, la cual a su vez podrá dimerizar y translocarse al núcleo para cumplir su función como factor transcripcional. En el núcleo este STAT3 permite la transcripción de IL-10, por lo que esta vía de señalización está participando como elemento de retroalimentación en la producción de esta citocina. Por otro lado, se ha descrito que para que se lleve a cabo la activación de la vía de señalización PI3K/Akt (Shi, J. *et al.*, 2016), es necesario que se lleve a cabo la fosforilación de PIP<sub>2</sub> a PIP<sub>3</sub> por la cinasa PI3K, permitiéndole a esta molécula activar a PDK1, quien a su vez activará a Akt y desembocará en la activación de mTORC1 (Figura 8). La activación de esta última está involucrada, como se mencionó anteriormente, con procesos de supervivencia y proliferación celular e inhibición de la autofagia (Figura 2).

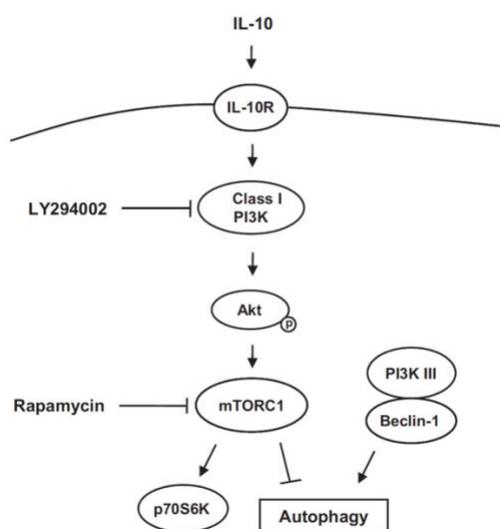
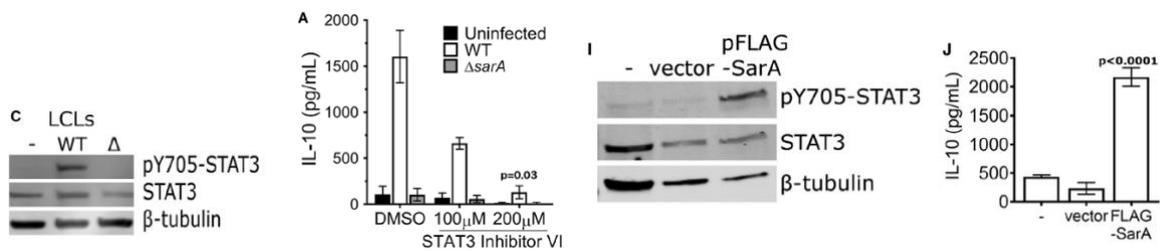


Fig. 8 **IL-10** inhibe mediante la activación de su receptor el proceso de autofagia a través de la vía **PI3K/Akt/mTORC1**. IL-10 es reconocido por su receptor (IL-10R) induciendo la activación de PI3K de clase I, permitiendo que se fosforile y active a Akt. Esta activación permite la formación del complejo mTORC1 activando a p70S6K, así como inhibiendo el proceso de autofagia. La utilización de LY294002, inhibidor de PI3K o rapamicina, inhibidor de mTOR, permiten la progresión de la autofagia (Modificado de *Park H., et al., Mol immunol. 2011*).

Otro de los efectores importantes de *Salmonella* recientemente descubierto corresponde al activador de la respuesta anti-inflamatoria por *Salmonella*, conocido como SarA, por sus siglas en inglés, el cual promueve la activación de STAT3 y producción de IL-10 (Jaslow S. L., *et al.*, 2018).

*Salmonella* ha desarrollado diversos mecanismos que le confieren ventaja sobre las células que infecta. Como ya se mencionó, SopB es uno de los efectores bacterianos más importantes descritos. Sin embargo, Jaslow S. *et al.*, demostraron en 2018 que el efector bacteriano codificado por la SPI-1, SarA, es capaz de activar el factor de transcripción STAT3, induciendo la expresión de la citocina anti-inflamatoria IL-10 y promoviendo la replicación intracelular. Este equipo de investigación logró demostrar que SarA era necesario y suficiente para que se lleve a cabo la fosforilación de STAT3 en su tirosina 705 (Figura 9).



**Fig. 9 Activación de STAT3 en presencia del efector SarA como elemento fundamental en la inducción de la secreción de IL-10.** En células de la línea celular linfoblastoide (LCLs por sus siglas en inglés), se lleva a cabo la activación de STAT3 mediante la fosforilación de ésta en su tirosina 705 durante la infección por *Salmonella* WT y no en *Salmonella* carente de SarA. Al inhibir la fosforilación de STAT3 disminuye significativamente la secreción de IL-10. La utilización de un vector que acarrea al gen sarA en células HeLa demostró que la presencia de la proteína sarA es suficiente para estimular la secreción de IL-10. Así, en ausencia de SarA se reduce significativamente la activación de STAT3 y por ende la secreción de IL-10, 48 horas post-infección, en comparación a lo observado en las células no infectadas o infectadas con la mutantes  $\Delta$ sarA (Tomando de Jaslow S. L., *et al.*, 2018).

Se demostró que la presencia de SarA en células de la línea celular linfoblastoide (LCLs) fue capaz por si sola de promover la fosforilación de STAT3. Se observó que a través de la activación de STAT3 (pSTAT3) en presencia del efector bacteriano se promueve la secreción, 24 horas post-infección de IL-10 en células HeLa infectadas con *Salmonella* Typhimurium, en comparación a las células sin infectar, infectadas con la mutante carente de sarA o tratadas con el inhibidor VI del factor de transcripción STAT3 (Jaslow S. L., *et al.*, 2018) (Figura 9). Así, el estado activado de STAT3 en células infectadas por *Salmonella* puede ser inducido por diversos efectores bacterianos lo que le confiere a la bacteria un mayor rango de elementos moleculares para manipular a la célula huésped y así favorecer su sobrevivencia y proliferación.

## **PROBLEMA DE INVESTIGACIÓN**

Con base en los hallazgos descritos en el artículo experimental de Sarah L. Jaslow *et al.*, en 2018 sobre el efecto de la molécula efectora sarA de *Salmonella enterica* serovar Typhimurium sobre la producción de IL-10 a través de la activación de STAT3 y los hallazgos descritos en el artículo experimental de Abraham García-Gil, *et al.*, en el mismo año, en los cuales se observó la activación de la vía de señalización PI3K/Akt en células B infectadas con *Salmonella* Typhimurium como células B aledañas no infectadas, se plantearon las siguientes preguntas;

**¿IL-10 inducido por *Salmonella* Typhimurium estaría participando en el encendido de la vía de señalización de PI3k/Akt/mTORC1 en células infectadas como en células B circundantes? De ser así, ¿cuál sería su efecto en la funcionalidad en los linfocitos B y el efecto biológico sobre la bacteria misma?**

## JUSTIFICACIÓN

La fiebre tifoidea es un problema mundial, del cual se han estimado más de 27 millones de casos nuevos cada año y causando un aproximado de 217 000 muertes (Crump J.A. & Mintz E.D., 2010). *Salmonella* Typhi infecta exclusivamente a humanos, sin embargo, los modelos animales para su estudio son pocos, siendo la infección con *S. Typhimurium* en ratones BALB/c y C57BL/6 la forma actual más asertiva para estudiar y entender la relación huésped-patógeno en la fiebre tifoidea (De Jong H. K., et al., 2012). El entendimiento de los mecanismos inmunológicos, como moleculares involucrados en la persistencia de la infección en linfocitos B es un buen acercamiento para entender mejor la enfermedad y su agente etiológico, acercándose a mejores propuestas biomédicas en un futuro.

## HIPÓTESIS

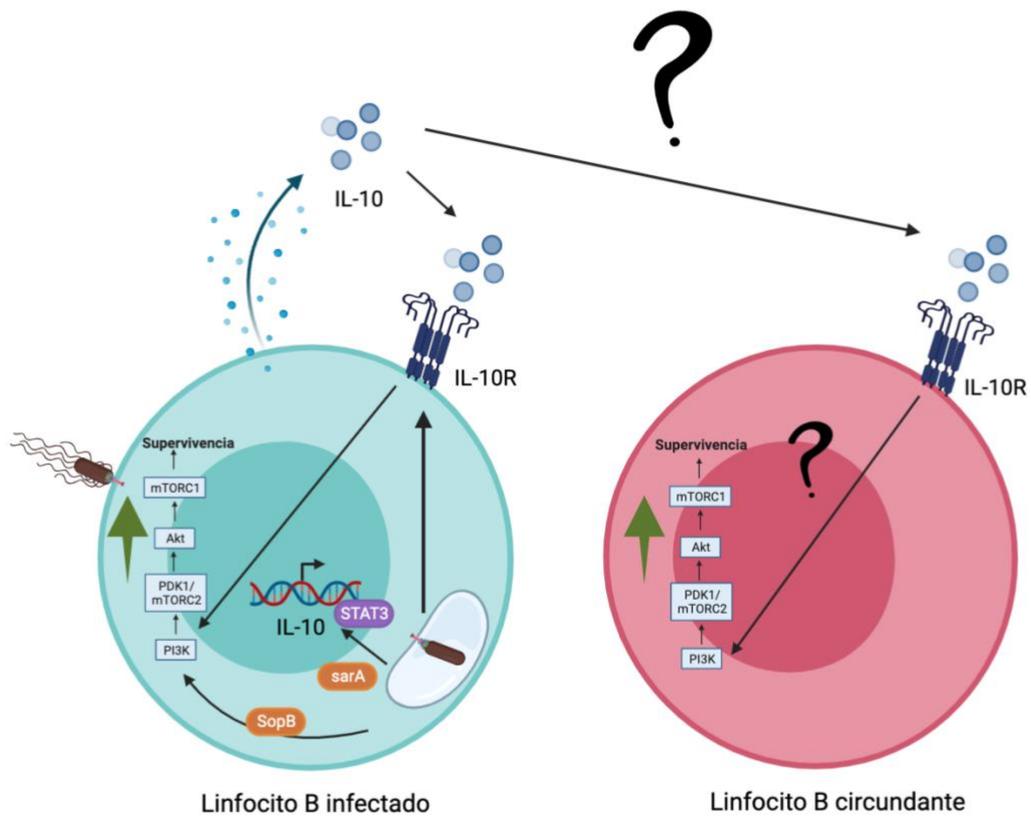


Fig. 10 Representación gráfica de la hipótesis del trabajo experimental.

La interleucina 10 secretada por linfocitos B infectados con *Salmonella Typhimurium* activa la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1 en los linfocitos B circundantes no infectados (Figura 10).

## **OBJETIVO GENERAL**

Evaluar el efecto de IL-10 producido por linfocitos B infectados con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium sobre la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1.

## **OBJETIVOS PARTICULARES**

1. Corroborar el impacto del efector bacteriano sarA en la secreción de IL-10 en linfocitos B infectados por *Salmonella* Typhimurium.
2. Evaluar la inducción de la expresión de IL-10 y su receptor (IL10R) en linfocitos B infectados por *Salmonella* Typhimurium.
1. Evaluar el efecto sinérgico de IL-10 inducida por *Salmonella* Typhimurium sobre la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1 en linfocitos B infectados de ratones C57BL/6 y su efecto inductor en la activación de esta vía en células no infectadas circundantes.

## MATERIALES Y MÉTODOS

### Modelo animal

Ratones C57BL/6 machos de 6 a 8 semanas entregados por la UPEAL; Protocolo 00-7814 con fecha de expiración el 31 de Diciembre del 2022.

Para poder cumplir con los objetivos planteados para este proyecto se utilizaron linfocitos B primarios;

#### - **Infección *in vitro* de linfocitos B primarios de ratón C57BL/6 mediante ensayo de protección**

De los bazos obtenidos de ratones C57BL/6 de 6 a 8 semanas de edad, se llevó a cabo la purificación de linfocitos B mediante selección negativa utilizando un kit de perlas magnéticas (B Cell Isolation kit mouse MACS Miltenyi Biotec).

- Se llevó a cabo un cultivo de 18 horas de *Salmonella* Typhimurium. Éste se resembró en medio LB líquido hasta obtener una densidad óptica a 600 nm de 0.6 (equivale a  $1.2 \times 10^9$  UFC/mL). A los linfocitos B purificados se les adicionó la suspensión bacteriana a una multiplicidad de infección (MOI) de 50 y se incubaron a 37°C/+CO<sub>2</sub> durante 10 minutos, se centrifugaron a 1.3 g, se eliminó el sobrenadante y se incubó el botón celular obtenido a 37°C/+CO<sub>2</sub> durante 20 minutos. Una vez transcurrido el tiempo de incubación se lavó dos veces con PBS + gentamicina (80 µg/mL) para eliminar la bacteria extracelular, así como detritos y se colocaron los linfocitos B infectados en medio RPMI + 10% SFB y gentamicina (80 µg/mL) a 37°C.

#### 1. **Corroborar el efecto del efector bacteriano sarA en la secreción de IL-10 en linfocitos B primarios infectados por *Salmonella* Typhimurium.**

Para cumplir con el primer objetivo se llevó a cabo una infección *in vitro* en linfocitos B primarios de ratón C57BL/6 con bacterias de la especie *Salmonella enterica* serovar Typhimurium mutada en los genes que codifican para los efectores bacterianos SarA y SopB ( $\Delta$ SarA y  $\Delta$ SopB) y silvestre de acuerdo al ensayo de protección descrito anteriormente.

#### - **Generación de la mutante SarA**

Para generar la mutante se llevó a cabo recombinación genética bacteriana (Santoyo G., 2008). Para esto, se lleva a cabo, mediante ingeniería del DNA, la recombinación homóloga a través de la transformación de *Salmonella* Typhimurium con el plásmido pKD46 que contiene a los genes de recombinación red de  $\lambda$  y el plásmido pKD4 que contiene el casete de resistencia a kanamicina (Fig. 11).

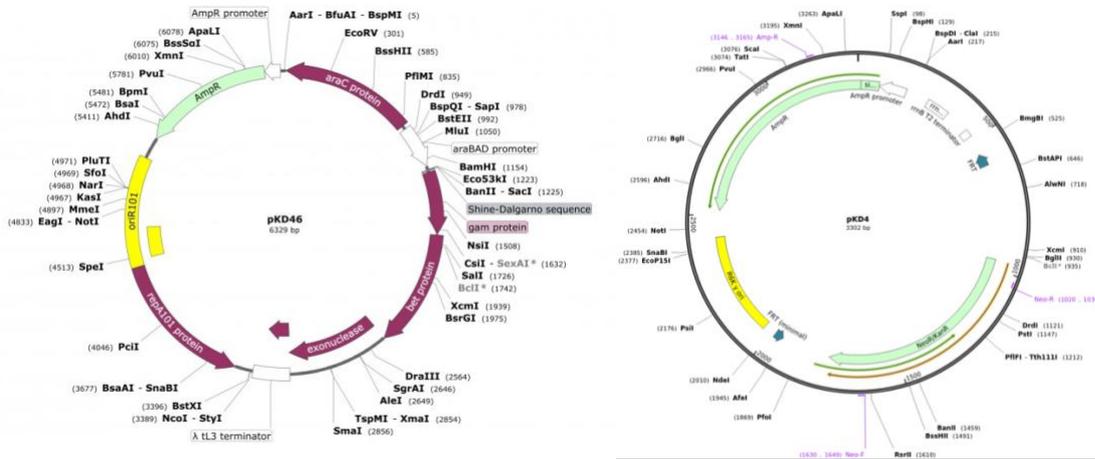


Fig. 11 **Plásmidos utilizados para la generación de la mutante  $\Delta$ SarA (pKD46 y pKD4)**. De izquierda a derecha: representación del plásmido pKD46; genes que codifican para el sistema de red  $\lambda$  (en púrpura), el casete de resistencia a ampicilina (verde) y su origen de replicación (amarillo). Además, la representación gráfica del plásmido pKD4; casete de resistencia a ampicilina y a Neomicina/kanamicina (verde), su promotor (blanco) y su origen de replicación (amarillo). Las extensiones representan los diferentes sitios de reconocimiento para las enzimas de restricción ahí indicadas (Figuras obtenidas de SnapGene con BLAST de Gene Bank).

Se llevó a cabo la extracción de DNA plasmídico de *Escherichia coli* (STM2585) mediante miniprep (obtención de plásmido por método tradicional) con el fin de extraer el plásmido pKD4. Una vez aislado el plásmido de interés se corrió un gel de agarosa al 1% durante 30 minutos a 100v posterior a la digestión; 4  $\mu$ L de plásmido con 3  $\mu$ L de la enzima de restricción Dde I a 37 °C en 2  $\mu$ L buffer O + 12  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O toda la noche.

Así mismo se inoculó en medio LB + ampicilina a la bacteria *Salmonella* Typhimurium acarreadora del plásmido pKD46. Al obtener el inóculo se plaqueó en agar LB + ampicilina con el fin de obtener colonias que posteriormente fueron utilizadas para generar células electrocompetentes como se describe posteriormente. Éstas fueron transformadas mediante electroporación con 20  $\mu$ L de amplificado (oligonucleótidos de pKD4 + secuencia de homología (regiones extremas del gen SarA):

pKD4 F	TCTTTAAAACTACTGCATGTAAGGGTCTCTCTTGTGCGATTGTGTAGGCTGGAGCTGCTTC
pKD4 R	GTGATCTACTATTTCGGCGAGCTATTTATAACGCTTTGTTGCTGACATGGGAATTAGCCATGGTCC

### - Generación de células electrocompetentes

Se pre-inocularon 100  $\mu$ L de bacteria en 3 mL de medio líquido LB + ampicilina (1  $\mu$ g/mL) a 30°C toda la noche. Al siguiente día se añadieron los 3 mL de inóculo a 100 mL de LB líquido complementado con 0.2% de arabinosa (activación de la transcripción de los genes de recombinación) y ampicilina (selección de las colonias pKD46+). Se incubó a 30°C en agitación hasta obtener una densidad óptica de 600 nm (0.4-0.6). Una vez que se alcanza esta densidad se coloca en tubos de 50 mL y se enfría en hielo por 30 minutos. Se centrifugó a 1600 g a 4°C por 15 minutos, se removió el sobrenadante y secó sobre papel absorbente. El botón se resuspendió en 40 mL de H<sub>2</sub>O milliQ fría y centrifugó de nuevo. Al obtener el nuevo botón, se resuspendió en 10 mL de H<sub>2</sub>O milliQ fría y repitieron los pasos anteriores. El botón resultante se resuspendió en 2 mL de H<sub>2</sub>O + 10% de glicerol frío y se dividió en 2 tubos de 15 mL. Se dejó incubar por 10 minutos en hielo para posteriormente centrifugarse y permitir la resuspensión del botón en 500  $\mu$ L de H<sub>2</sub>O + 10% de glicerol frío.

Adicionalmente se diseñaron oligonucleótidos para corroborar la inserción del cassette de resistencia a kanamicina (Kan):

Kan F	AGGCTATTCGGCTATGACTG
Kan R	CGGCCACAGTCGATGAATCC

Para corroborar la obtención de la mutante SarA se llevó a cabo un ensayo funcional con las diferentes colonias: *Salmonella* Typhimurium silvestre,  $\Delta$ SopB y  $\Delta$ SarA. Primero se realizó un ensayo de protección. A las 24hrs post-infección se colocaron 3.5 millones de linfocitos B provenientes de cada una de las condiciones dentro de insertos de *Transwell* (*cell QART 0.4  $\mu$ m PET clear*) y se colocaron en una placa de 12 pozos para cultivo celular, previamente cargada con 3 millones de linfocitos B primarios no infectados. Los niveles de secreción de IL-10 fueron evaluados a través de ensayos de ELISA (estandarizado del protocolo *Murine IL-10 Standard ABTS ELISA Development Kit* de PEPROTECH).

Con el fin de corroborar el efecto de SarA y SopB en la secreción de IL-10, en el sobrenadante de las células infectadas con *S. Typhimurium* WT,  $\Delta$ SarA y  $\Delta$ sopB, así como en los linfocitos B no infectadas, se cuantificaron los niveles de IL-10 mediante ELISA, usando el mismo kit antes mencionado.

Para la ELISA se llevó a cabo la siguiente metodología:

1. Diluir el anticuerpo de captura en PBS a una concentración de 2 µg/mL. Añadir 100 µL a cada pozo de la placa, sellar e incubar a temperatura ambiente toda la noche.
2. Aspirar los pozos y lavar 4 veces con 300 µL de solución amortiguadora de lavado. Posterior al último lavado invertir la placa y golpear suavemente en papel absorbente.
3. Añadir 300 µL de buffer de bloqueo (BSA 2% en PBS) e incubar 1 hora a temperatura ambiente.
4. Lavar la placa 4 veces y añadir 100 µL de muestra para la curva estándar (2000 pg/mL a 0 pg/mL) o de muestra problema e incubar 2 horas a temperatura ambiente.
5. Aspirar pozos y lavar 4 veces. Añadir 100 µL de anticuerpo de detección (0.05 µg/mL) e incubar 2 horas a temperatura ambiente.
6. Aspirar y lavar 4 veces. Añadir 100 µL de conjugado avidina-HRP (1:2000 en diluyente; 0.05% Tween-20, 0.01% BSA en PBS) e incubar 30 minutos en oscuridad a temperatura ambiente.
7. Aspirar y lavar 4 veces. Añadir 100 µL de solución de sustrato (ABTS) a cada pozo e incubar en oscuridad a temperatura ambiente durante 30 minutos (se revisan los valores en el lector de placas por intervalos de 5 minutos hasta un máximo de 30 minutos a una absorbancia de 405 nm).

\*\*\* Se revisa que la absorbancia para 0 pg/mL no sea mayor a 0.2 y 1.4 para 2000 pg/mL.

## 2. Evaluar la inducción de la expresión de IL10R en linfocitos B primarios infectados por *Salmonella Typhimurium*.

Se trabajó con los linfocitos B primarios (provenientes de la infección *in vitro*); se evaluó la expresión de IL-10R a nivel de mRNA como de proteína de acuerdo a la siguiente metodología:

En cada caso, se evaluaron tanto a los linfocitos infectados (GFP+) como a los linfocitos no infectados (GFP-). Se llevó a cabo la extracción de RNA total y se efectuó la evaluación de la expresión del mRNA de IL-10R (subunidad α), así como del mRNA de IL-10 mediante RT PCR punto final, utilizando los siguientes oligonucleótidos (primers):

Secuencia 5' -> 3'

IL-10 F	GCTCTTGCACTACCAAAGCC
IL-10 R	ACACCTTGGTCTTGGAGCTTAT
IL-10Rα F	CCTGGATCTGTATCACCGAAGC
IL-10Rα R	CTCCGACCACTCTGCCTTGTTA
IL-10Rβ F	CTTCTGGTGCCAGCTCTAGG

En cuanto a la evaluación de la expresión de IL-10R y su citocina correspondiente a nivel de proteína se llevaron a cabo ensayos por citometría de flujo empleando los anticuerpos acoplados a fluorocromos; CD210-PE específico para IL-10R $\alpha$  (PE anti-mouse CD210 Catalogo No. 112706 de Biolegend) y anti-IL10-PE para específico para la citocina IL10 (*PE Rat Anti-mouse IL-10* No. 561060 de BD Pharmigen).

La interleucina 10 secretada por linfocitos infectados con *Salmonella Typhimurium* activa la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1 en los linfocitos B circundantes no infectados (Figura 10). Para demostrar este dato se estableció el siguiente objetivo:

**3. Evaluar el efecto sinérgico de IL-10 inducida por *Salmonella Typhimurium* sobre la vía de señalización PI3K/Akt en linfocitos B primarios infectados de ratones C57BL/6 y su efecto inductor en la activación de esta vía en células no infectadas circundantes.**

Para poder cumplir con el tercer objetivo se llevó a cabo una serie de ensayos con insertos *Transwell (cell QART 0.4  $\mu$ m PET clear)*; en los cuales se colocaron en el pozo superior a las células infectadas y en el pozo inferior a todos nuestros linfocitos B sin infectar, esto con el fin de evaluar el efecto de IL-10 sobre la vía de señalización de PI3K/Akt en los linfocitos B circundantes.

Una vez transcurridas 24 horas post-infección se llevó a cabo, mediante *Western Blot*, la evaluación de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1. Para ello, se determinó el estado de fosforilación de Akt en su Thr 308, además de la detección de pS6 Ser 235/236 (molécula que nos permite determinar si está activado mTORC1) y ULK1 en su Ser 757 (fosforilación causada por mTORC1 y necesaria para la inhibición de la autofagia). Se evaluaron los niveles proteicos de GAPDH como control de carga.

- Obtención de proteínas totales:

Se recuperaron las células de los insertos por un lado (región superior) y las de los pozos por otro (región inferior). Se conservó el sobrenadante tras centrifugar a 1.3g x 5 minutos (ver la descripción de la ELISA más adelante). Se lavó el botón con PBS y se volvió a centrifugar. El nuevo botón se resuspendió en 120  $\mu$ L de RIPA, se agitó en vórtex y se inóculo por 15 minutos

en hielo (intervalos de agitación por vórtex cada 5 minutos). Se centrifugó a 1.3 g x 10 minutos y se recolectó el sobrenadante en donde se contiene la proteína de interés. Se realizó una curva de albúmina (*Pierce TM BCA Protein Assay Kit*) ( $R^2= 0.99$ ) con el fin de cuantificar las muestras problema y llevar a cabo los ensayos de *Western Blot*.

Una vez cuantificadas las muestras, se llevó a cabo la siguiente metodología para la realización del Western Blot:

1. Se añadieron 30  $\mu\text{g}$  de proteína (muestras problema) en buffer Laemmli 6x y se cargaron en un gel de acrilamida al 12%:

Soluciones para el gel de electroforesis de Tris/Glicina SDS-poliacrilamida al 12%

Gel separador (10 mL)	
H <sub>2</sub> O	3.3
Acilamida al 30%	4.0
Tris 1.5 M (pH 8.8)	2.5
SDS 10%	0.1
APS 10%	0.1
TEMED	0.004
Gel concentrador (5 mL)	
H <sub>2</sub> O	3.4
Acilamida al 30%	0.83
Tris 1.0 M (pH 6.8)	0.63
SDS 10%	0.05
APS 10%	0.05
TEMED	0.005

2. Se corrió el gel a 100 V hasta ver desaparecer el frente de corrido.
3. Para la transferencia se activó la membrana PVDF anteriormente con metanol por 1 minuto. Se transfirió a 250 mA durante 2 hora y media.
4. Terminada la transferencia se corroboró su correcta realización mediante tinción con rojo *ponceau* y se lavó.
5. La membrana se bloqueó con leche al 5% durante 1 hora y se añadió 1 mL de solución con anticuerpo primario (1:1000) (pS6, pULK1 y GAPDH), (1:250) (pAkt) toda la noche.
6. Se realizaron 3 lavados con TBS-T al 0.1% por 10 minutos cada uno.
7. Se incubó  $\alpha$ -Rabbit HRP 1:3000 por 1 hora y media.
8. Se volvieron a realizar 3 lavados con TBS-T al 0.1% por 10 minutos cada uno.
9. Se revelaron las membranas en 100  $\mu\text{L}$  cada uno con el kit NZY ECL (peróxido y luminol) 1:1.
10. Se llevó a cabo el desnudado de la membrana para incubar con anti-GAPDH;

- Cubrir las membranas con solución amortiguadora de desnudado durante 30 minutos, descartar y repetir con buffer nuevo.
- Lavar con PBS durante 10 minutos, 2 veces.
- Lavar con TBST por 5 minutos, 2 veces.
- Bloquear y repetir desde el paso 5-9.

## RESULTADOS

### 1.1 Generación de la mutante *Salmonella* Typhimurium $\Delta$ SarA

El objetivo de este trabajo fue determinar el efecto de IL-10 inducido por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium sobre la funcionalidad de los linfocitos B, así como su efecto sobre la bacteria dentro de la célula. Para ello, se llevaron a cabo numerosos experimentos como se describe en materiales y métodos.

En las figuras 12 A y B se muestran dot blots representativos del porcentaje de purificación de los linfocitos B de ratones C57BL/6 aislados mediante selección negativa de esplenocitos totales. El porcentaje esperado y reportado en la literatura de linfocitos B (aprox. 55%) (Pellegrini, A., *et al.* 2007) corresponde al 48.9% obtenido de la disección del bazo de los ratones. Tras la purificación mediante selección negativa con perlas magnéticas se obtuvo una pureza del 97.9% de células CD19+ (linfocitos B). Además, se determinó el porcentaje de infección para cada ensayo. Se muestran en la figura 12 C los distintos porcentajes alcanzados con base en su positividad a GFP (bacteria intracelular). El porcentaje de linfocitos B no expuestos a *Salmonella* (no infectados/ GFP-) es de 0%, de linfocitos B infectados con *Salmonella* WT (GFP+) es de 3.63% y de células B infectadas con *Salmonella*  $\Delta$ sopB (cepa resistente a Cloranfenicol) (GFP+) es de 3.42%. Cabe destacar que este porcentaje de infección es suficiente para observar un efecto en los linfocitos B.

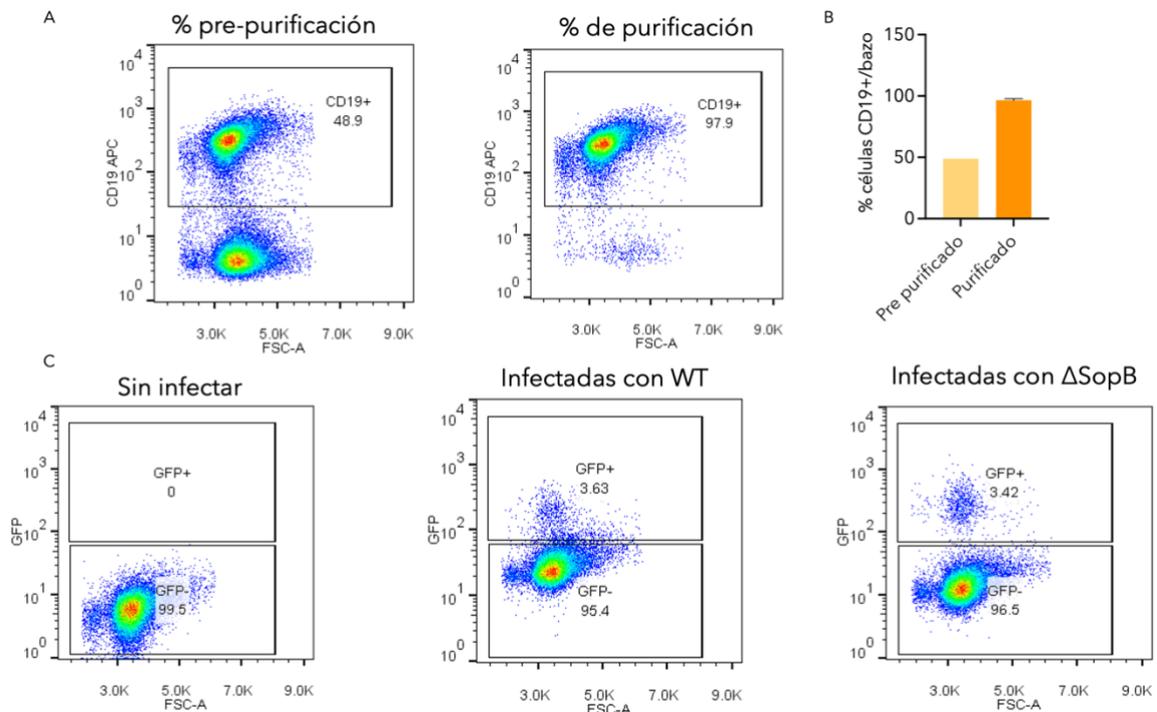
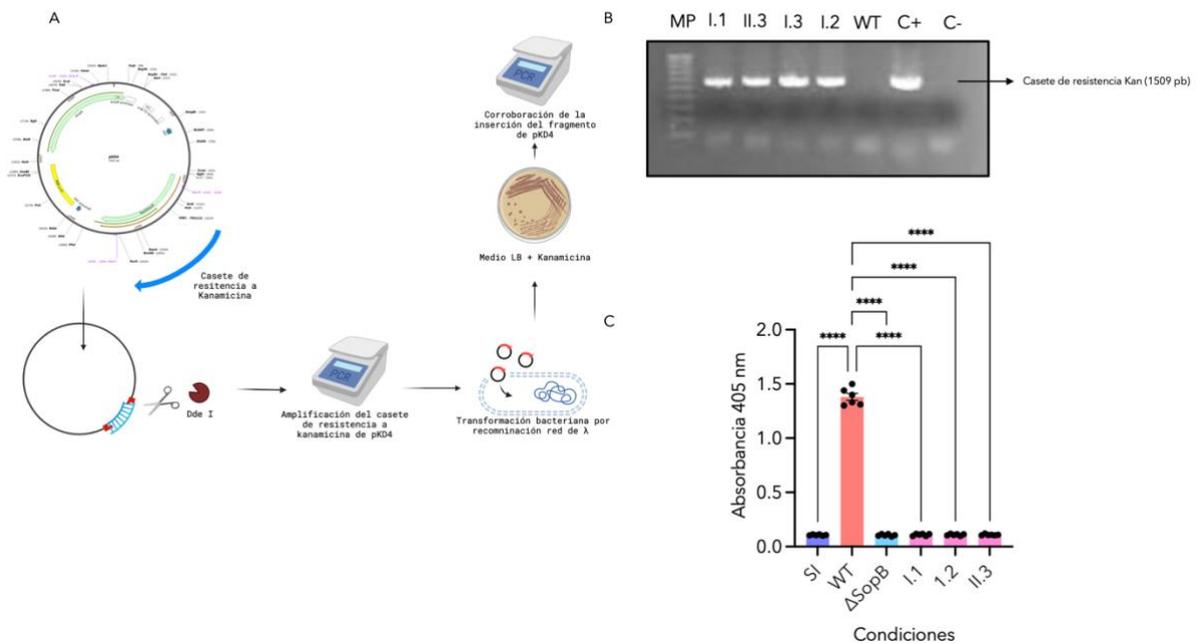


Fig. 12 **Purificación de linfocitos B a partir de esplenocitos por medio del kit B Cell Isolation kit mouse MACS Miltenyi Biotec y porcentaje de infección.** Dot blots representativos de las poblaciones purificadas; **A)** Esplenocitos totales teñidos con anti-CD19 para identificar linfocitos B antes (48.9 %) y después (97.9%) de la purificación. **B)** Se graficaron los resultados de los porcentajes de pureza por selección negativa. **C)** Los linfocitos B purificados se infectaron con *Salmonella* WT o  $\Delta$ SopB a una MOI de 50. Se analizaron los porcentajes de infección para todas las condiciones; sin infectar (0%), infectadas con WT (3.63%) e infectadas con  $\Delta$ SopB (3.42%).

Con el fin de ampliar el panorama experimental se llevó a cabo la generación de una nueva mutante para corroborar el efecto del efector bacteriano *sarA* en la secreción de IL-10 (Jaslow S. L., *et al.*, 2018) en linfocitos B primarios infectados por *Salmonella* Typhimurium. Se generaron bacterias (*Salmonella* Typhimurium acarreadoras del plásmido pKD46) electrocompetentes. Se obtuvieron los amplificadores del casete de resistencia a kanamicina (pKD4) junto con las regiones de homología para *sarA* y se transformaron las bacterias (Figura 13 A) (ver material y métodos). Tras la transformación se llevó a cabo la corroboración de la inserción del casete de resistencia a kanamicina mediante PCR de punto final (PCR de colonia). Se obtuvieron bandas de 1509 pb, correspondiendo al peso esperado para el amplificador del nuevo inserto en las posibles mutantes (I.1, I.2, I.3 y II.3), así como la ausencia de banda en la bacteria WT (Figura 13 B). Adicionalmente, se llevó a cabo un ensayo funcional para determinar la veracidad de la delección del gen *sarA*. Para esto se llevaron a cabo ensayos de ELISA, midiendo los niveles de IL-10 en sobrenadante de linfocitos B primarios infectados con 3 de las 4 mutantes candidatas (I.1, I.2 y II.3). Este ensayo nos permitió determinar cuál de las probables mutantes corresponden realmente a  $\Delta$ SarA. Observamos que las absorbancias

obtenidas para los niveles de secreción de IL-10 en el sobrenadante de células B sin infectar (SI),  $\Delta$ SopB, así como infectadas con las posibles mutantes (I.1, I.2 e II.3) no son significativamente diferentes entre sí, indicando que en estas condiciones la secreción de esta citocina es prácticamente nula. Sin embargo, sí se observaron diferencias significativas entre las condiciones anteriormente mencionadas y las absorbancias obtenidas de los sobrenadantes de células infectadas con *Salmonella* Typhimurium WT, las cuales fueron mayores, evidenciando la presencia de sarA y su actividad estimuladora de IL-10 a través de los altos niveles de secreción de esta misma (Figura 13 C). La generación de esta mutante permitirá, en futuros ensayos, corroborar el papel de IL-10 en el proceso de infección, ya que esta bacteria es incapaz de inducir la producción de esta citocina en los linfocitos B (Jaslow S. L., *et al.*, 2018).



**Fig. 13 Generación de *Salmonella* Typhimurium  $\Delta$ SarA por sistema de recombinación red  $\lambda$ .** **A)** Esquema experimental de la generación de bacterias *Salmonella* Typhimurium  $\Delta$ SarA (ver materiales y métodos) **B)** PCR punto final para corroborar la sustitución del gen SarA por el amplificado del casete de resistencia a kanamicina (1509 pb). Se muestran los resultados del gel de agarosa 1.2%: Marcador de peso molecular, las 4 colonias de bacterias transformadas/mutantes, *Salmonella* Typhimurium WT, el plásmido pKD4 (control positivo) y control negativo (H<sub>2</sub>O). **C)** Ensayo funcional; 24hrs post-infección se tomó el sobrenadante de linfocitos B primarios infectados con *Salmonella* Typhimurium de las colonias WT,  $\Delta$ SopB, mutante I.1, II.3 y I.2 ( $\Delta$ SarA) a una MOI de 50. Se realizó una ELISA para medir los niveles de IL-10 a una absorbancia de 405 nm. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar. Estadística: ANOVA de una cola y prueba de Tuckey, significancia  $p < 0.05$ .

## 1.2 *Salmonella* Typhimurium induce la expresión de IL-10 y su receptor IL-10Ra

Se evaluó la inducción de la expresión de IL10R e IL-10 en linfocitos B primarios infectados por *Salmonella Typhimurium*. Para esto se llevó a cabo un análisis de expresión de los niveles de mRNA para ambas moléculas por PCR de punto final (Figura 14), así como los niveles de ambas proteínas mediante citometría de flujo (Figura 15-16).

En el caso de la expresión de mRNA se observó una tendencia de aumento de los niveles de expresión del mensajero en los linfocitos B primarios infectados con *Salmonella* WT en comparación a las otras condiciones (Figura 14 A). Se observó una disminución significativa en los niveles de mRNA para il10 en los grupos de linfocitos B no infectados e infectados con  $\Delta$ SopB (Figura 14 B). Aunque sin valor significativo, los niveles de expresión de RNAm para la subunidad inducible de su receptor (il10R $\alpha$ ), así como los de la subunidad  $\beta$  del receptor, comparado con los niveles observados en los linfocitos infectados con *Salmonella* WT, tienden a ser menores cuando no se infectan estos linfocitos o cuando se infectan con la mutante para SopB (Figura 14 C-D). Estos resultados muestran que la infección por *Salmonella* WT induce la expresión de mRNA de il10 y las subunidades que conforman a su receptor en los linfocitos B.

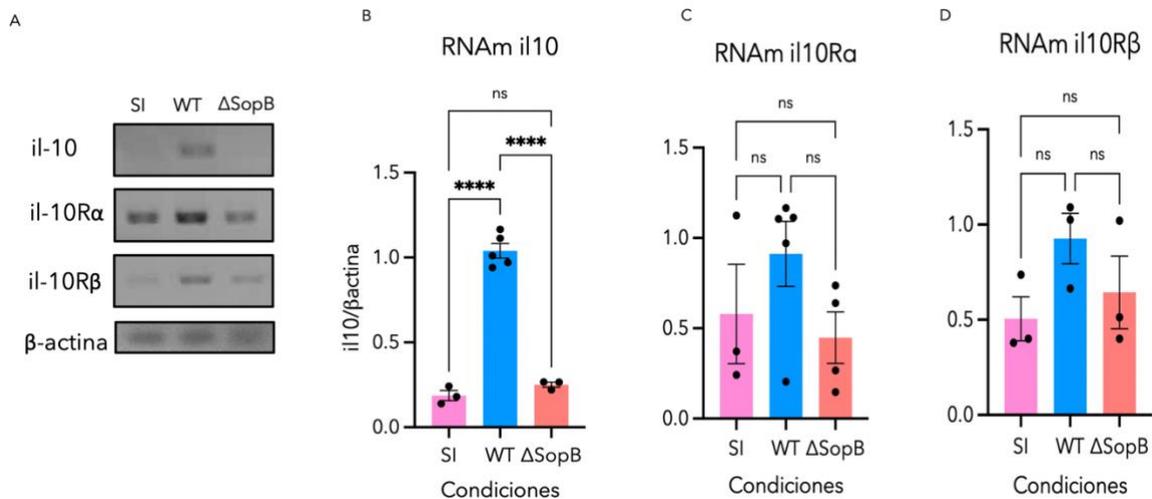


Fig. 14 *Salmonella Typhimurium* induce la expresión de il10 e il10R en linfocitos B primarios. Se infectaron linfocitos B primarios con *Salmonella* WT o *Salmonella*  $\Delta$ SopB. Se llevó a cabo la extracción de mRNA total 24 horas post-infección y se evaluaron los niveles de il10, il10R $\alpha$  e il10 $\beta$  y  $\beta$ -actina como control de carga. **A)** Gel representativo de agarosa al 1.2% para il10, il10R $\alpha$  e il10 $\beta$  y  $\beta$ -actina como control de carga. **B-C)** Se graficaron los resultados de las densitometrías de las bandas obtenidas de 4 experimentos independientes. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar. Análisis estadístico: ANOVA de dos colas y prueba de Tuckey. Significancia  $p < 0.05$ . **D)** Se graficaron los resultados de las densitometrías promedio de las bandas obtenidas para cada experimento.

Como se mencionó anteriormente, se evaluaron los niveles proteicos mediante citometría de flujo. Se infectaron esplenocitos totales a una MOI de 50 con *Salmonella* Typhimurium WT (Figura 15 A) o *Salmonella* Typhimurium  $\Delta$ SopB (Figura 15 B). Mediante citometría de flujo se seleccionó, para ambas condiciones, a las poblaciones CD19+ y se analizaron los porcentajes de linfocitos CD19+/GFP+ (linfocitos B infectados) y CD19+/GFP- (linfocitos B no infectados) productores de IL-10. Se observó, aunque éste no fue significativo, un aumento en el porcentaje de linfocitos CD19+ GFP+ productores de IL-10 tanto para los infectados con la mutante como con la silvestre (WT) (Figura 15 C) en comparación a los linfocitos B GFP- de las 3 distintas condiciones probadas. Los resultados obtenidos demuestran que la infección intracelular por *Salmonella* Typhimurium promueve la producción de IL-10 en los linfocitos B esplénicos de ratones C57BL/6.

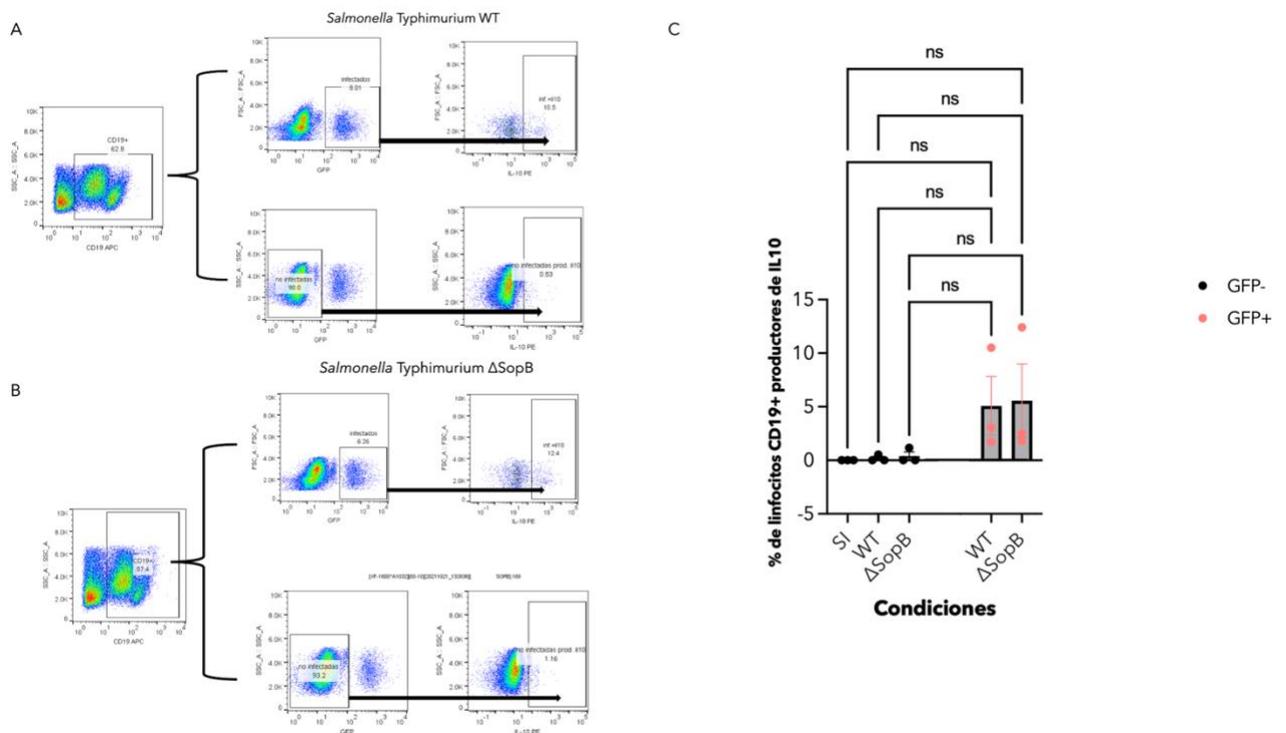
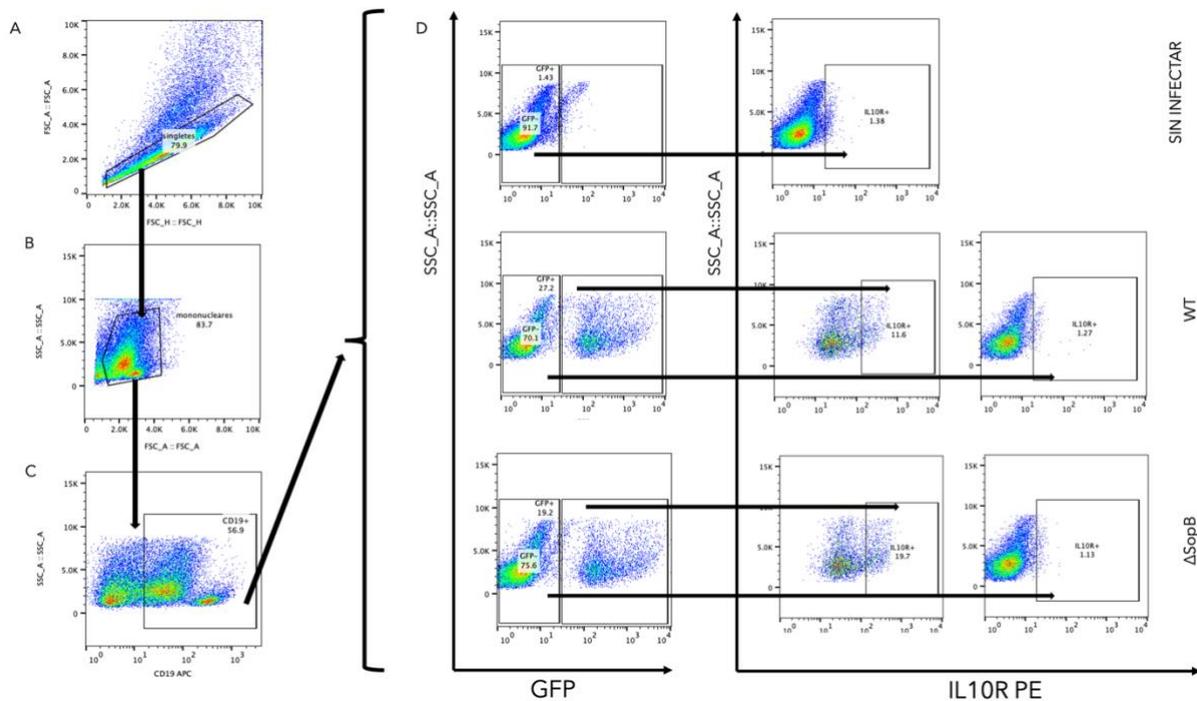


Fig. 15 **La infección intracelular por *Salmonella* Typhimurium promueve la producción de IL-10 en linfocitos B.** Se infectaron esplenocitos totales de ratones C57BL/6 con **A)** *Salmonella* Typhimurium WT y **B)** *Salmonella* Typhimurium  $\Delta$ SopB; a una MOI de 50, se trataron con brefeldina A 4 horas antes de cumplirse las 24 horas post-infección y se analizaron las muestras. Se muestran dot blots representativos de la evaluación de los niveles de producción de IL-10 para estos dos grupos, además de un grupo de células no infectadas. Se delimitaron las regiones con base en el FMO-1. **C)** Se graficaron los niveles de linfocitos CD19+ productores de IL-10 en las distintas condiciones (GFP+ y GFP-). Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar. Análisis estadístico: ANOVA de dos colas y prueba de Tuckey. Significancia  $p < 0.05$ .  $n=3$ .

Por otro lado, se demostró a través de ensayos por citometría de flujo que la infección intracelular por *Salmonella* Typhimurium promueve la expresión de IL10R $\alpha$  en linfocitos B.

El análisis de citometría de flujo mostró la presencia de una población CD19+ derivada de una población de células mononucleares de bazo de ratones C57BL/6 (Figura 16 A-C). Para las condiciones; sin infectar, infectadas con *Salmonella* WT e infectadas con *Salmonella*  $\Delta$ SopB se evaluaron los porcentajes de positividad para los marcadores de GFP generando 2 poblaciones distintas. De estas poblaciones GFP+ o GFP- se determinó el porcentaje de expresión del receptor de IL-10 en su subunidad inducible (IL10R $\alpha$ ) (Figura 16 D). Se graficaron los porcentajes obtenidos de 3 experimentos independientes y se logró observar que los porcentajes de expresión de este receptor en superficie se mantenía bajo en las poblaciones de los linfocitos B que no estuvieron en presencia de la bacteria (no infectados), así como en las poblaciones de linfocitos B GFP-. Sin embargo, se observó un incremento significativo en las poblaciones infectadas con *Salmonella* Typhimurium WT GFP+, así como con la mutante ( $\Delta$ SopB GFP+) en comparación a los demás grupos, alcanzado porcentajes de hasta 19.7 %. Por lo tanto, se pudo demostrar que la presencia de la bacteria promueve el aumento en las poblaciones de linfocitos CD19+/CD210+ (IL10R).



E

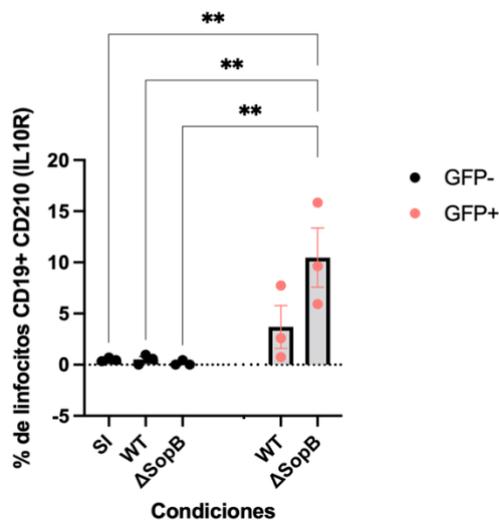


Fig. 16 La infección intracelular por *Salmonella Typhimurium* promueve la expresión de IL10R $\alpha$  en linfocitos B. Acotamiento de subpoblaciones de linfocitos B primarios infectados con *Salmonella* 24 horas post-infección. **A)** Selección de los singletes, conforme al área y altura **B)** A partir de la selección de células individuales, se analizaron por las características de complejidad y tamaño, observándose una población bien definida de células mononucleares **C)** A partir de esta población se delimitaron los cuadrantes positivos al marcador de superficie CD19 **D)** Dot blots representativos para cada una de las condiciones (Sin infectar, infectadas con *Salmonella* WT o con *Salmonella*  $\Delta$ SopB); separando las poblaciones GFP+ y GFP- que expresan a IL10R $\alpha$  (CD210 PE). Se delimitaron las regiones con base en el FMO-1. **E)** Se cuantificó el porcentaje de linfocitos CD19+/CD210+ infectados o no en las diferentes condiciones dentro de los grupos GFP+ y GFP-. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar. Análisis estadístico: ANOVA de dos colas y prueba de Tukey. Significancia  $p < 0.01$ .  $n=3$ .

Como parte importante del abordaje experimental, se determinaron en diferentes condiciones los niveles de secreción de IL-10 en el sobrenadante de linfocitos B primarios. Para esto se purificaron linfocitos B de células de bazo total (ver metodología), los cuales fueron posteriormente infectados con *Salmonella Typhimurium* WT o  $\Delta$ SopB. En este caso se pretendió evaluar la producción de IL-10 en presencia de la bacteria intracelular y en ausencia de ella. Los resultados demuestran, proporcionalmente a los valores de absorbancia, niveles de secreción estadísticamente más elevados en las poblaciones de linfocitos B infectados con *Salmonella* WT en comparación a los no infectados, así como los infectados con *Salmonella*  $\Delta$ sopB (Figura 17). Se pudo observar una tendencia en el incremento de la secreción de la citocina IL-10 en presencia de la bacteria intracelular en esta estirpe celular.

#### A Niveles de IL10 en sobrenadante de linfocitos B primarios

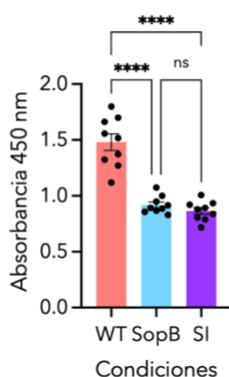
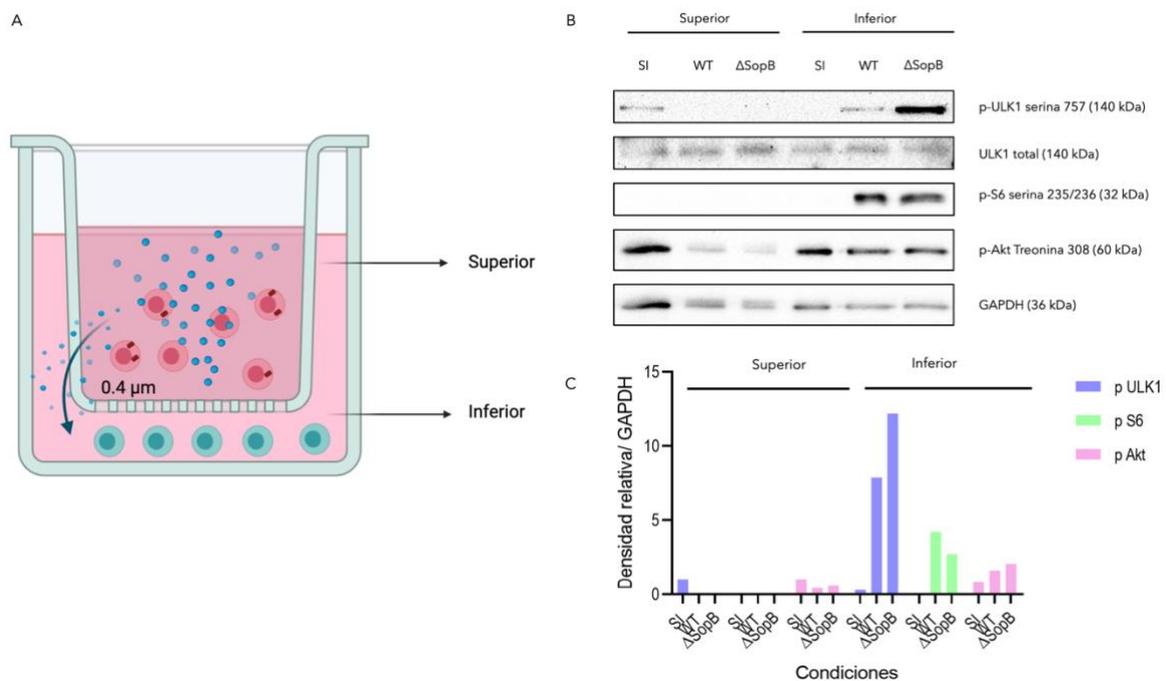


Fig. 17 *Salmonella Typhimurium* promueve la secreción de IL-10 en linfocitos B primarios. A) Se tomó el sobrenadante 24 horas post-infección de un cultivo celular de linfocitos B primarios no infectados e infectados con *Salmonella Typhimurium* WT y  $\Delta$ sopB a una MOI de 50. Se evaluaron los niveles de secreción de IL-10 mediante ensayos de ELISA. Las absorbancias se graficaron para cada condición a partir de 3 experimentos independientes promediados. Análisis estadístico: ANOVA de 1 cola y prueba de Tuckey. Las barras representan el promedio  $\pm$  error estándar. Significancia  $p < 0.05$ . \* = 0.0435-0.0178, \*\*\*\* = 0.0031.

### 1.3 La producción de IL-10 por los linfocitos B infectados promueve la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1 en linfocitos B circundantes.

Como primer acercamiento para determinar el efecto de la producción y secreción de IL-10 por parte de los linfocitos B infectados con *Salmonella Typhimurium* sobre los linfocitos B circundantes y la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1, se llevó a cabo un ensayo de *Transwell* mediante el cual se expusieron estos últimos a las diversas moléculas solubles secretadas por las células infectadas (Figura 18 A). Se evaluaron los niveles de p-ULK1 en su serina 757, pS6 en su serina 235/236 y la primera fosforilación de Akt (treonina 308) para determinar el papel de la bacteria en la activación de esta vía de señalización y su papel en la inhibición de la autofagia. Se pudo observar que los niveles de fosforilación de las 3 moléculas antes mencionadas fueron notablemente menos sintetizadas en las células B de las 3 condiciones de la fase superior, contrariamente a lo que se observó con los grupos de linfocitos circundantes (regiones inferiores), en donde los niveles de fosforilación tienden a ser los más altos, con excepción de la expresión de p-ULK1 y p-S6 en donde es nula. Cabe destacar que los niveles de proteínas ULK1 y S6 fosforilados están ausentes en los lisados de linfocitos B de la región superior, a pesar de que, en el caso de ULK1, por ejemplo, sus niveles totales se mantienen en todos los grupos y condiciones. Adicionalmente, los niveles de p-ULK1 y p-Akt son visibles en los grupos SI de la región superior, mientras están disminuidos o ausentes en este grupo a diferencia de lo que se observa claramente como un nivel de expresión mayor

obtenido en los lisados de los linfocitos B circundantes (Figura 18 B-C). En general, aunque aún no con valor significativo (n=2), parece ser que existe una tendencia que indica que los niveles de fosforilación de estas proteínas de la vía de PI3K/Akt/mTORC1 son mayores en células circundantes que en las mismas células infectadas (Figura 18 C). Conforme a los resultados se puede deducir la probable participación de un factor soluble secretado por los linfocitos B infectados sobre los linfocitos B aledaños y el encendido de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1 en estas mismas a las 24 horas post-infección con *S. Typhimurium*.



**Fig. 18 La secreción de IL-10 por los linfocitos B infectados intracelularmente por *Salmonella Typhimurium* promueve la activación de la vía de señalización de PI3K/kt/AmTORC1 en células circundantes.** **A)** Esquema descriptivo del ensayo de Transwell, indicando en donde se colocaron las células B infectadas bajo diferentes condiciones (SI, WT,  $\Delta$ SopB) y las células circundantes, no infectadas. Se ubican en la región superior e inferior, respectivamente. **B)** Western Blot representativo de los niveles de p-ULK1 en su serina 757, ULK1 total, pS6 en su serina 235/236 y p-Akt en su treonina 308 obtenidos del lisado total de células B de la región superior e inferior 24 horas post-infección a una MOI de 50 con *Salmonella Typhimurium* WT,  $\Delta$ SopB y sin infectar. Se normalizaron los datos en relación al control de carga GAPDH. **C)** Normalización de la densidad relativa con GAPDH para las distintas condiciones de infección en linfocitos B, representado los niveles de p-ULK1 en su serina 757, pS6 en su serina 235/236 y p-Akt en su treonina 308 en linfocitos B infectados (WT,  $\Delta$ SopB y SI) y linfocitos B circundantes.

## DISCUSIÓN

Alrededor de 5% de los pacientes con fiebre tifoidea se convierten en portadores crónicos de *Salmonella* Typhi en la vesícula biliar (Levine M. M., *et al.*, 1982). Así, se han llevado a cabo diferentes estudios en ratones, con el fin de asemejar los efectos de la fiebre tifoidea que se presentan en el hombre, a través de modelos de infección que demuestran que *Salmonella* Typhimurium es capaz de inducir su ingreso en los linfocitos B y permanecer dentro de vacuolas por largos periodos de tiempo (Rosales-Reyes R., *et al.*, 2005). Esta cronicidad se debe a la capacidad que ha desarrollado esta bacteria de evadir a los mecanismos celulares que permiten su eliminación. Como se mencionó anteriormente, la acción de efectores bacterianos, como SopB, participan en la inhibición de la piroptosis (Rosales-Reyes R., *et al.*, 2012), la inhibición de la autofagia (Park H., *et al.*, 2011; Lopez-Bailon L., *et al.*, 2022), entre otros (Figura 1). Sin embargo, todavía existen mecanismos de evasión del sistema inmunológico que emplea la bacteria por dilucidar y describir.

Dicho esto, uno de los mecanismos probables en participar en este tipo de mecanismo huésped-patógeno es la activación de vías de señalización como PI3K/Akt (Park H., *et al.*, 2011) y Jak/STAT (Verma R., *et al.*, 2016) a través de la activación del receptor de IL-10 mediante su unión con la citocina IL-10. Por eso, se hipotetizó que la IL-10 secretada por linfocitos B infectados con *Salmonella* Typhimurium activa la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1 en los linfocitos B infectados, así como en los linfocitos B circundantes no infectados (Figura 10). Para demostrar la siguiente propuesta se propuso evaluar el efecto de IL-10 producido por linfocitos B infectados con *Salmonella enterica* serovar Typhimurium sobre la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1.

Es importante mencionar que se llevó a cabo la purificación de linfocitos B a partir de esplenocitos totales, así como la obtención del porcentaje de infección (Figura 12). Como se mencionó anteriormente, los porcentajes normales reportados para la población de linfocitos B en bazo (Pellegrini, A., *et al.* 2007) indica que los linfocitos B de la población total de esplenocitos fue realizada de manera correcta. De manera similar para el porcentaje de purificación que se encuentra por arriba del 95%. Es importante mencionar que el porcentaje de infección obtenido (aproximadamente del 3.5 %) es suficiente para observar efectos biológicos de la bacteria sobre los linfocitos B (Perez -Lopez, A., *et al.*, 2013; García-Gil A.,

*et al.*, 2018). Dicho esto, se procedió con los ensayos que permitieron determinar la expresión de IL-10 y su receptor en las distintas condiciones ya antes descritas.

Tomando en cuenta que el efector bacteriano involucrado en la producción de IL-10 corresponde a SarA, se llevó a cabo la generación de una mutante con el fin de añadir una condición que permitiera evaluar la participación de IL-10 tanto en linfocitos B infectados como en los linfocitos B circundantes. La ausencia del gen de SarA pudo identificarse a través de la inserción del casete de resistencia a kanamicina a través de cultivos bacterianos y de colonias por presión de selección. A pesar de haber observado la amplificación del casete de resistencia, que indica justamente la delección exitosa del gen SarA, se comprobó adicionalmente que efectivamente los niveles de IL-10 disminuyeran debido a la ausencia de este efector bacteriano. Así, este resultado permitió corroborar el efecto de SarA en la secreción de IL-10 en linfocitos B infectados por *Salmonella* Typhimurium. Estos datos fueron los esperados, de igual manera como se ha reportado previamente que a una MOI de 30 disminuyen significativamente los niveles en la producción de IL-10 en células infectadas con la cepa  $\Delta$ SarA (Jaslow S. *et al.*, 2018). Es importante mencionar que la generación de esta mutante se llevó a cabo simultáneamente a los demás experimentos y fue el último de los objetivos que se logró alcanzar, por lo que no se utilizó esta cepa bacteriana como condición en la realización experimental. Adicionalmente, se esperaba que los niveles de IL-10 secretados por las células B infectadas con *Salmonella*  $\Delta$ SopB se asemejaran a los niveles observados en los linfocitos no infectados debido a que, como ya se ha reportado, bajo esta condición los niveles de IL-10 disminuyen considerablemente a una MOI de 50, 24 horas post-infección (García-Gil A., *et al.*, 2018). No debemos descartar, sin embargo, que existe la posibilidad de que la disminución en los niveles de secreción de IL-10 sea consecuencia de la ausencia en la viabilidad bacteriana, conferida importantemente por el efector SopB (García-Gil A., *et al.*, 2018) y no por el efecto directo de este último efector.

Los linfocitos B juegan un papel importante en la producción de citocinas anti-inflamatorias como IL-10 e IL-35, las cuales están asociadas a la disminución de la respuesta inmunológica y permiten a ciertas especies de bacterias sobrevivir y llevar a cabo la progresión de la infección (García-Gil A., Lopez-Bailon L. U. & Ortiz-Navarrete V., 2019). Tomando en cuenta que IL-10 es una molécula soluble que puede estar participando en los mecanismos de resistencia de *Salmonella* Typhimurium dentro de los linfocitos B como probables nichos, se evaluaron los niveles de ésta en el sobrenadante de células B bajo tres condiciones distintas. Como primer

acercamiento se evaluaron a las 24 horas post-infección los niveles de secreción de IL-10 y se observó que los niveles de secreción generados por la infección con *Salmonella* Typhimurium WT, a ese tiempo, son significativamente mayores a los niveles de secreción de esta citocina observados en los linfocitos B infectados con  $\Delta$ SopB o sin infectar (Figura 17). Estos datos concuerdan con la literatura, en donde se describe una alta secreción de IL-10 tras la infección por *Salmonella* Typhimurium WT (Jaslow S. *et al.*, 2018). Adicionalmente, los datos concuerdan con los hallazgos de García-Gil A., *et al.*, en 2018, en donde se describió una disminución significativa de los niveles de secreción de IL-10 en los lisados de linfocitos B infectados con la mutante  $\Delta$ SopB. Este fenómeno se observó también en nuestros experimentos, en donde los niveles de secreción de IL-10 son prácticamente los mismos para la condición SI e infectada con la mutante  $\Delta$ SopB, respaldando los datos antes mencionados. En ausencia del efector SopB la bacteria es incapaz de replicarse y sobrevivir, por ende, no es capaz de sintetizar proteínas como sarA y consecuentemente de inducir la producción de IL-10 (García-Gil A., *et al.*, 2018). Resultaría útil evaluar los niveles de STAT3 fosforilado en su tirosina 705 en los linfocitos B infectados como en los linfocitos B no infectados, esperando observar la fosforilación de esta molécula. Esta modificación post-traducciona estaría indicando la activación, dimerización y traslocación al núcleo del factor de transcripción para el gen que codifica para IL-10 tanto en las células B infectadas como en las que estarían en contacto con los efectores bacterianos secretados por las bacterias o moléculas efectoras secretadas por los linfocitos B infectados sobre ellos mismos y en los aledaños en ausencia de la fosfatasa SopB.

Sin el efector bacteriano SopB la sobrevivencia disminuye significativamente, por lo que la bacteria disminuye, así como aumenta la muerte celular en los linfocitos B infectados (García-Gil A., *et al.*, 2018). Esto debido a que SopB activa la vía de PI3K-YAP y promueve la sobrevivencia dentro de la bacteria, así como la transcripción y efecto de los efectores bacterianos como SarA. Al estar ausente la bacteria viable dentro del linfocito, los efectores no se expresan y por ende no se observa el efecto que se ve en las infectadas con WT. En este caso, explicando por que los niveles de IL-10 se asemejan a las no infectadas en las infectadas con  $\Delta$ SopB.

Por otro lado, y con el fin de sustentar nuestra hipótesis se evaluaron los niveles de expresión a nivel de mRNA de il-10, así como de il-10R $\alpha$  e il10R $\beta$ . Los datos permitieron determinar que la presencia de *Salmonella* intracelular es capaz de inducir la expresión de dichas moléculas. Se mostraron los datos para il10, il10R $\alpha$  e il10R $\beta$ , los cuales fueron normalizados con el gen

constitutivo  $\beta$ -actina. Los resultados de densitometría, aunque no todos significativos, muestran un aumento en los niveles de expresión de mRNA de la citocina y las dos subunidades de su receptor en las células infectadas con WT, mientras que los niveles para los grupos no infectados o infectados con  $\Delta$ SopB se asemejan. Así, los niveles de mRNA la subunidad constitutiva ( $il10R\alpha$ ) y la subunidad inducible ( $il10R\alpha$ ) se ven aumentados 24 horas post-infección. Se sustentó la hipótesis de que los niveles del mensajero fueran más altos en las condiciones de infección, sin embargo, se observó lo opuesto en el caso de los linfocitos B infectados con la mutante, lo cual se mantiene consistente con el hecho de que se pierde viabilidad bacteriana y por ende la transcripción de los genes que conforman el cromosoma bacteriano. Tomando en cuenta que se requieren de ambas subunidades para que se activen las vías de señalización río abajo IL-10/IL-10R (Glocker, *et al.*, 2011), la ausencia de alguna de las subunidades del receptor podría afectar la activación de estas vías por lo que era de esperar que los niveles de IL-10 e IL-10R $\alpha$  se asemejaran. Es decir, existe una correlación directa entre la expresión de  $il10$  y los constituyentes de  $il10R$ . Sin embargo, se esperaría que los niveles de RNAm cuantificados para la subunidad  $\beta$  se hubieran mantenido semejantes en las distintas condiciones, ya que se trata de la subunidad constitutiva. Sin embargo, estos resultados podrían explicarse tomando en cuenta que se requieren de múltiples miembros de la familia de IL-10, como IL-22 además de IL-10, los cuales comparten todos esa subunidad, para que se vea favorecida la colonización bacteriana en el intestino y la residencia de las bacterias en los tejidos linfoides intestinales, así como limitar la inflamación crónica en mamíferos (Fung, T. C., *et al.*, 2016). Esto explicaría porqué los niveles de mRNA para las subunidades  $\alpha$  y  $\beta$  se observan tan similares. La subunidad constitutiva parecería ser ligeramente mayor que la observada para la subunidad inducida porque se requiere no solamente para la citocina de interés, IL-10, sino también para otras citocinas de la misma familia que pueden estar siendo secretadas tras la infección por *Salmonella*. Sin embargo, no se debe descartar el hecho de que la vida media del mRNA puede diferir entre genes, así como los niveles de los productos traducionales generados a partir estas biomoléculas.

Dicho lo anterior, se llevaron a cabo ensayos por citometría de flujo con el fin de evaluar la inducción de la expresión de IL-10R en linfocitos B infectados y evaluar el efecto sinérgico de IL-10 inducidos por *Salmonella Typhimurium* sobre la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1 en linfocitos B infectados de ratones C57BL/6 y su efecto inductor en la vía de activación de esta misma vía en células no infectadas circundantes.

La infección intracelular por *Salmonella* Typhimurium promueve la producción de IL-10 en linfocitos B. Para consolidar los datos obtenidos por PCR (niveles de mRNA). Se llevaron a cabo ensayos por citometría de flujo, analizando linfocitos B infectados con la bacteria WT y  $\Delta$ SopB, ambas GFP+, permitiéndonos identificar la infección exclusivamente intracelular. Se evaluaron los niveles de IL-10 intracelular y se observó la generación de 2 poblaciones CD19+ (Figura 15 A-B); CD19+<sup>high</sup> de baja complejidad y CD19+<sup>low</sup> de complejidad mayor. Estos resultados corresponden a un fenómeno ya reportado. Tras la activación de los linfocitos B infectados, su morfología, por ejemplo, se aprecia una disminución en el tamaño de su núcleo y aumento en su cantidad de lisosomas (Ulloa, R., *et al.*, 2021). Sin embargo, de estos resultados lo que nos interesa son los porcentajes de linfocitos B infectados. Esta población celular produjo un porcentaje mayor de IL-10 intracelular en comparación a los GFP-. Este resultado indica que la infección por *Salmonella* WT o  $\Delta$ SopB induce la producción de IL-10, mientras que las células B que estuvieron en contacto con la bacteria, pero que no alcanzaron a endocitar, no es capaz de inducirla, al menos a las 24 hrs post-infección. Aunque la diferencia no sea significativa, la tendencia es clara. Se sugiere realizar más experimentos in vivo para lograr alcanzar un valor lo suficientemente claro para observar diferencias significativas.

Con el fin de complementar los resultados descritos anteriormente, se evaluó la presencia de IL-10R $\alpha$  (CD210) en linfocitos B infectados y no infectados demostrando que 24 horas post-infección la infección intracelular con esta bacteria promueve la expresión de esta subunidad del receptor de IL-10 en estas células, sin embargo, en los linfocitos B GFP- no se observó un incremento importante en el porcentaje de linfocitos B CD210+. A través del sistema de secreción de tipo III se secreta una gran cantidad de efectores bacterianos, promoviendo distintos efectos biológicos involucrados en la sobrevivencia de la bacteria dentro del linfocito B desde muy temprana empezada la infección (30 minutos post-infección) (García-Gil A., *et al.*, 2018). Los niveles bajos de expresión de CD210 en los linfocitos B GFP- puede deberse al tiempo en el que se evaluaron los niveles de esta molécula en superficie, ya que su expresión máxima podría ser antes o después de las 24 horas post-infección. Tomando en cuenta este hallazgo se puede sugerir entonces que el encendido de la vía de IL-10/IL-10R favorece el mantenimiento de la inhibición de procesos pro-inflamatorios (Sindhava, V. J., & Bondada, S., 2012). Además de estar participando posiblemente, a través de mecanismos de evasión del sistema inmunológico, como inmunosupresor en la presentación de antígeno mediante MHC II (Verma, R., *et al.*, 2016) así como en la inhibición de la autofagia (Park H., *et al.*, 2011).

Tomando en cuenta la importancia de la producción IL-1 $\beta$  como consecuencia de la formación del inflamasoma como mecanismo para eliminar la infección bacteriana (García-Gil A., *et al.*, 2018). La producción de IL-10 desfavorece la maduración de IL-1 $\beta$  e IL18, por ende, su secreción, así como la activación de la caspasa 1 vía la activación del inflamasoma NLRC4 por la detección de flagelina y los efectores FliC y FlipB (Vladimer, G. I., *et al.*, 2013). Por otro lado, las células B de ratón infectadas con *Salmonella* son capaces de producir TNF- $\alpha$  e IL-6 al igual que los macrófagos, sin embargo, no pueden secretar IL-1 $\beta$ . Ello como consecuencia de que la bacteria introduce el efector SopB al citosol del linfocito B. SopB activa la vía de señalización PI3K/Akt, provocando una desregulación de la NLRC4 y por consiguiente la secreción de IL-1 $\beta$  (Figura 1). Juntando todos estos elementos, podemos hipotetizar que IL-10/IL-10R es un elemento que actúa sinérgicamente junto con la actividad de efectores bacterianos como SopB y SarA a través de su participación en las vías de señalización de PI3K/Akt, Jak/STAT y mTORC1 (Figura 2) y que favorece el mantenimiento de los efectos adaptativos/evasivos que desencadena la bacteria sobre la célula B de una infección temprana (Monack, D. M., *et al.*, 2000) a una infección a largo plazo.

Finalmente, se llevaron a cabo los ensayos *Tranwell* con el fin de evaluar el efecto sinérgico de IL-10 inducida por *Salmonella* Typhimurium sobre la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1 en linfocitos B infectados de ratones C57BL/6 y su efecto inductor en la activación de esta vía en células no infectadas circundantes. Tomando en cuenta que los resultados indican que existe una mayor cantidad de proteína fosforilada ULK1, Akt y S6 (todos elementos importantes de la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1) en los lisados de linfocitos B adyacentes, que como ya habíamos mencionado antes, corresponden al grupo linfocitario que jamás ha entrado en contacto con la bacteria, que en los lisados de las células infectadas. Este dato es importante ya que como Lopez-Bailon, *et al.*, demostraron, es necesaria la fosforilación de ULK1 a través de mTORC1 para que pueda inhibirse la autofagia en los linfocitos B infectados, permitiendo la sobrevivencia de *Salmonella* en estas células.

Los resultados obtenidos en cuanto a los niveles de fosforilaciones de Akt en las células sin infectar de las regiones superior e inferior (Figura 18 B) se obtuvieron resultados no esperados. Sin embargo, existen varias explicaciones de lo que podría estar sucediendo en esos casos. Primero, debemos recordar que se llevó a cabo la evaluación de la primer fosforilación de activación de Akt, por lo que observar la presencia de ésta no necesariamente indicaría que la molécula esté completamente activada y, por ende, no afecta de la misma manera proteínas que

se encuentran río abajo de la vía, como ULK1 o S6. La activación parcial de Akt es suficiente como para encender la vía, sin embargo, Akt necesita ser fosforilada en su serina 473 a través de mTORC2 para que suceda la activación completa (Aldecoa, F. & Ávila, J. 2021). Además, se debe de tomar en cuenta que se evalúa una vía de señalización que no sólo es afectada por la interacción de IL-10 y su receptor o por la presencia de sopB, sino también por activación de otras moléculas como los receptores tirosin cinasas.

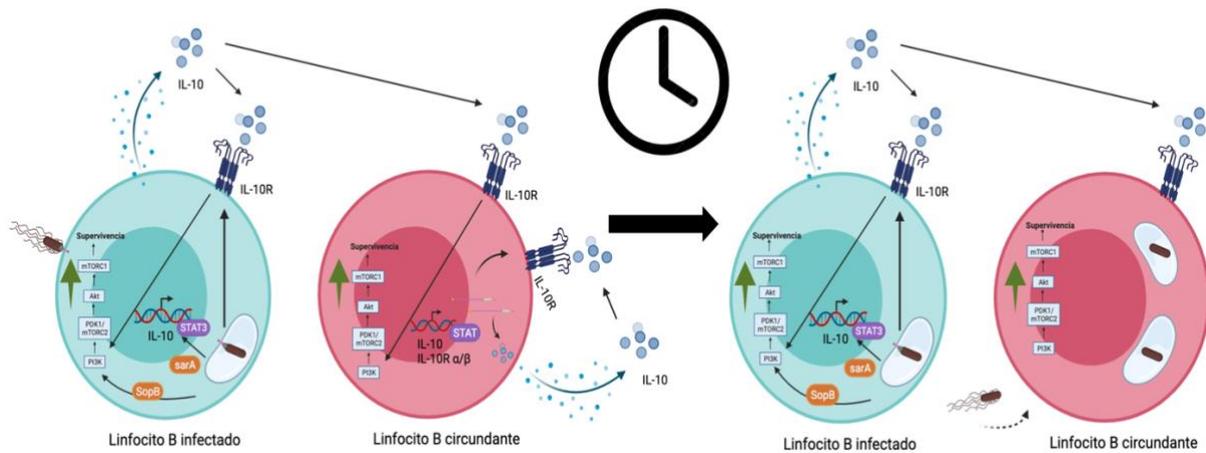
Retomando los hallazgos importantes de estos ensayos de *Transwell*, se sugiere que el efector bacteriano sopB no es el único elemento secretado durante la infección por *Salmonella Typhimurium* capaz de activar la vía de señalización de PI3K/Akt/mTORC1 en los linfocitos B circundantes a las 24 horas post-infección, así como a 3 horas post-infección (Lopez-Bailon L. U., *et al.*, 2022). Otros elementos estarían participando en este proceso. En nuestro caso, apostamos a la molécula soluble IL-10, secretada en niveles más elevados debido a la infección por *Salmonella* y su efector bacteriano sarA. En la figura 18 C se pudieron observar niveles similares en cuanto a la expresión de las proteínas antes mencionadas en los lisados de linfocitos B de la región inferior de las condiciones de infección con *Salmonella* WT y  $\Delta$ SopB. Esta observación, al menos a las 24 horas post-infección, respalda la hipótesis de que no es el efector bacteriano SopB el que provoca el encendido de la vía sino el efector celular IL-10 secretado a niveles más altos en presencia de la bacteria. Cabe mencionar que se ha descrito que *Salmonella Typhimurium* tiene la habilidad de fluctuar entre estados de persistencia y replicación (Cruz-Cruz, 2019), por lo que sería interesante evaluar los estados de activación de las vías de señalización sobre los cuales actúa la bacteria en estos linfocitos, su efecto biológico sobre los linfocitos B y sobre la bacteria misma.

Es importante hacer referencia a la producción de IL-10 mediante la activación de su vía de señalización IL-10/IL-10R. Se han descrito dos fenómenos antagonistas sobre los efectos de la activación de TLR4 por LPS. Por un lado, se ha demostrado que la incitación de los linfocitos B con ligandos de TLR4 promueve la producción de IL-10 (O' Garra A., *et al.*, 1992; Heine G., *et al.*, 2008), mientras que Perez-Lopez A., *et al.*, describieron que los LPS sintetizados por *Salmonella*, a través de la activación de TLR4, son capaces de promover la expresión de pro-IL-1 $\beta$ . Sin embargo, las células B de ratón infectadas con *Salmonella* no son capaces de escindir a pro-IL-1  $\beta$  a su forma madura. Se llevaron a cabo ensayos metabólicos mediante *SeaHorse* en los que se evaluaron diferentes condiciones de infección, incluyendo una condición de infección con bacteria muerta por calor, limitando solamente a la bacteria afectar a su

hospedero a través de sus PAMPs. Los resultados preliminares estarían indicando que los fenómenos inducidos por la bacteria son preferentemente consecuencia de los efectores bacterianos y no otros elementos de la bacteria misma. Se observaron niveles similares a los que se obtienen en las condiciones de ausencia de la bacteria (linfocitos no infectados) e infectados por bacterias muertas por calor (datos no mostrados).

La participación de IL-10/IL-10R inducidos por la infección de *Salmonella* Typhimurium en la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1 en linfocitos B permite la generación de un nicho favorable para el establecimiento en la cronicidad de la infección de esta misma bacteria. Es importante de igual manera profundizar esta línea de investigación ya que como se describió a lo largo de este trabajo, son varios los mecanismos y vías que participan en el mantenimiento de la infección intracelular por *Salmonella* Typhimurium dentro de los linfocitos B. Es posible creer que mecanismos como la formación de exosomas promovidos por la misma secreción de IL-10 (Schülke, S. 2018), estarían siendo los responsables de favorecer la generación de un ambiente propicio en los linfocitos B infectados, así como en los linfocitos circundantes, preparándolos a una futura posible infección tras la replicación bacteriana, permitiendo el establecimiento a largo plazo en los pacientes con salmonelosis. Estos exosomas podrían estar conteniendo efectores bacterianos. Por otro lado, el evaluar elementos distintos a SopB también puede permitir la elucidación de mecanismos como el origen infeccioso de linfocitos B diferenciados a células plasmáticas y la exocitosis de esta misma en estas estirpes celulares (Hybiske, K. & Stephens R.S., 2008). Además de otros elementos que ya se han descrito están involucrados en los mecanismos de evasión del sistema inmunológico por parte de *Salmonella* Typhimurium en los ratones, como PD-L1 (López-Medina, *et al.*, 2015).

## CONCLUSIONES



La participación de IL-10/IL-10R inducidos por la infección de *Salmonella Typhimurium* en la vía de señalización PI3K/Akt/mTORC1 en linfocitos B permite la generación de un nicho favorable para el establecimiento en la cronicidad de la infección de esta misma bacteria, además de la inhibición de la piroptosis, la autofagia, entre otros aumentando la posibilidad de sobrevivida a la bacteria, no solamente en linfocitos B infectados sino también en los linfocitos B circundantes.

## PERSPECTIVAS

Se espera seguir con los experimentos que permitirán demostrar que los resultados obtenidos y descritos anteriormente son resultado del efecto de la molécula soluble IL-10. Para esto se sugiere importantemente realizar los ensayos en condiciones de exposición a un anticuerpo neutralizante anti-IL-10. Se podrá así demostrar el efecto biológico de esta citocina y determinar la participación de otros elementos biológicos como exosomas u otros efectores bacterianos y celulares. Se propone llevar a cabo la obtención de nuevas imágenes de inmunofluorescencia como las descritas por García-Gil Abraham *et al.*, en 2018 utilizando un anticuerpo anti-PIP3 en las condiciones ya probadas y en nuevas condiciones como en linfocitos B primarios infectados con *Salmonella*  $\Delta$ SarA.

Se llevarían a cabo ensayos de *Transwell* con las mismas condiciones anteriormente descritas, con la diferencia de que para estos ensayos se ocuparía un anticuerpo anti-IL-10 neutralizante con el fin de demostrar que efectivamente el efecto biológico de IL-10 tiene lugar, a través de la evaluación de las determinaciones descritas en el párrafo anterior.

Se ha reportado que IL-10 promueve la proliferación de células B activadas (Rousset, *et al.*, 1992). Sin embargo, se ha reportado en una línea celular de leucemia linfática crónica de células B que IL-10/IL-10R promueve la diferenciación, más no la proliferación celular a través de STAT3 y STAT1 (Jurlander, *et al.*, 1997). Dicho esto, se propone evaluar el efecto de la activación de la vía de señalización PI3K/Akt inducido por IL-10 sobre la proliferación, ciclo celular y diferenciación de linfocitos B primarios de ratones C57BL/6 infectados *in vitro* e *in vivo* por *Salmonella* Typhimurium y no circundantes a través de diversos ensayos. Mediante citometría de flujo se propone evaluar el ciclo celular utilizando Yoduro de propidio y H3S10p (Fosfo-H3). Por otra parte, y con el fin de evaluar el efecto sobre la proliferación debido a la activación de la vía de señalización de PI3K/Akt, inducido por IL-10, se propone llevar a cabo un análisis generacional por dilución de tinción de CellTrace™ Violet, así como un análisis de proliferación mediante la incorporación de EdU cuantificada por citometría de flujo.

Finalmente, se pretende evaluar el efecto sobre la diferenciación celular. Para esto, se evaluará la presencia de células plasmáticas mediante tinción con anti-CD138 y anti-B220. Además, y de manera paralela se llevaría a cabo un ensayo de ELISA en el sobrenadante de linfocitos B infectados y no infectados para detectar la presencia de IgM e IgG. Estas perspectivas tienen como propósito el complementar y completar el trabajo que se presenta en la siguiente tesis y

así proponer un mecanismo molecular más completo respecto al papel de IL-10 y su participación en los procesos huésped patógeno entre *Salmonella Typhimurium* y los linfocitos B.

## BLOGRAFÍA

- Akdis, C. A., Joss, A., Akdis, M., Faith, A., & Blaser, K. (2000). A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *The FASEB Journal*, 14(12), 1666-1668.
- Arai T, Hiromatsu K, Nishimura H, Kimura Y, Kobayashi N, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y. 1995. Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during Salmonella infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213:600–7
- Burmeister, A. R., & Marriott, I. (2018). The interleukin-10 family of cytokines and their role in the CNS. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 458.
- Cai, G., Nie, X., Zhang, W., Wu, B., Lin, J., Wang, H., ... & Shen, Q. (2012). A regulatory role for IL-10 receptor signaling in development and B cell help of T follicular helper cells in mice. *The Journal of Immunology*, 189(3), 1294-1302.
- Crump J.A., Mintz E.D. (2010) Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin Infect Dis* 50: 241–246.
- Cruz-Cruz, A. (2019). Salmonella promueve su persistencia y sobrevivencia intracelular en linfocitos B, mediante dos mecanismos independientes. CINVESTAV-IPN.
- De Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T., & Wiersinga, W. J. (2012). Host–pathogen interaction in invasive salmonellosis.
- Donnelly, R. P., Sheikh, F., Kotenko, S. V., & Dickensheets, H. (2004). The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *Journal of leukocyte biology*, 76(2), 314-321.
- Fung, T. C., Bessman, N. J., Hepworth, M. R., Kumar, N., Shibata, N., Kobuley, D., ... & Sonnenberg, G. F. (2016). Lymphoid-tissue-resident commensal bacteria promote members of the IL-10 cytokine family to establish mutualism. *Immunity*, 44(3), 634-646.
- Garcia-Gil A., Galan-Enriquez C. S., Perez-Lopez A., Nava P., Alpuche-Aranda C., Ortiz-Navarrete V., SopB activates the Akt-YAP pathway to promote Salmonella survival within B cells. *Virulence*. 2018;9: 1390–1402.
- Garcia-Gil, A., Lopez-Bailon, L. U., & Ortiz-Navarrete, V. (2019). Beyond the antibody: B cells as a target for bacterial infection. *Journal of leukocyte biology*, 105(5), 905-913.
- Glocker, E. O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N., & Grimbacher, B. (2011). IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1246(1), 102-107.
- Han X, Wang S, Fan Y, Yang J, Jiao L, Qiu H, et al. Chlamydia infection induces ICOS ligand-expressing and IL-10-producing dendritic cells that can inhibit airway inflammation and mucus overproduction elicited by allergen challenge in BALB/c mice. *J Immunol* (2006) 176:5232–9. doi:10.4049/jimmunol.176.9.5232
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53-66.
- Heine, G. et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 promotes IL-10 production in human B cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 2210–2218 (2008).
- Ho, A. S., Liu, Y., Khan, T. A., Hsu, D. H., Bazan, J. F., & Moore, K. W. (1993). A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23), 11267-11271.
- *IL-10 Cytokine Family Signaling Pathway*. (2014). [www.Rndsystems.Com. https://www.rndsystems.com/pathways/il-10-cytokine-family-signaling-pathway](https://www.rndsystems.com/pathways/il-10-cytokine-family-signaling-pathway)
- Jaslow S. L., Gibbs K. D., Fricke W. F., et al. Salmonella activation of STAT3 signaling by SarA effector promotes intracellular replication and production of IL-10. *Cell Rep*. 2018; 23:3525–3536.
- Jaslow, S. L., Gibbs, K. D., Fricke, W. F., Wang, L., Pittman, K. J., Mammel, M. K., ... & Ko, D. C. (2018). Salmonella activation of STAT3 signaling by SarA effector promotes intracellular replication and production of IL-10. *Cell reports*, 23(12), 3525-3536.
- Jurlander, J., Lai, C. F., Tan, J., Chou, C. C., Geisler, C. H., Schriber, J., ... & Caligiuri, M. A. (1997). Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 89(11), 4146-4152.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., & Achtman, M. (2002). Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, Genetics and Evolution*, 2(1), 39-45.
- Levine, M. M., Black, R. E., and Lanata, C.: Precise Estimation of the Numbers of Chronic Carriers of Salmonella typhi in Santiago, Chile, an Endemic Area. *The Journal of Infectious Diseases* 146, 724{726 (1982).
- López Bailón Luis Uriel. (2018). Análisis del papel del complejo 1 del blanco de rapamicina en mamíferos en la infección de linfocitos B murinos por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Ciudad de México.
- López-Medina, M., Carrillo-Martín, I., Leyva-Rangel, J., Alpuche-Aranda, C., & Ortiz-Navarrete, V. (2015). Salmonella impairs CD8 T cell response through PD-1: PD-L axis. *Immunobiology*, 220(12), 1369-1380.
- Lopez-Medina, M., Perez-Lopez, A., Alpuche-Aranda, C., & Ortiz-Navarrete, V. (2015). Salmonella induces PD-L1 expression in B cells. *Immunology letters*, 167(2), 131-140.
- Luis, L. B., Ana, G. T., Carlos, G. E., Abraham, G. G., Iris, E. G., Martha, M. L., & Vianney, O. N. (2022). Salmonella Promotes Its Own Survival in B Cells by Inhibiting Autophagy. *Cells*, 11(13), 2061.
- Martín-Orozco, N., Isibasi, A., & Ortiz-Navarrete, V. (2001). Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon- $\gamma$  activation. *Immunology*, 103(1), 41-48.
- Mathur, R., Oh, H., Zhang, D., Park, S. G., Seo, J., Koblansky, A., ... & Ghosh, S. (2012). A mouse model of Salmonella typhi infection. *Cell*, 151(3), 590-602.
- Mittrücker, H. W., & Kaufmann, S. H. (2000). Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. *Journal of leukocyte biology*, 67(4), 457-463.
- Monack, D. M., Hersh, D., Ghori, N., Bouley, D., Zychlinsky, A., & Falkow, S. (2000). Salmonella exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *The Journal of experimental medicine*, 192(2), 249-258.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19(1), 683-765.
- Neves P., Lampropoulou V., Calderon-Gomez E., et al. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during Salmonella Typhimurium infection. *Immunity*. 2010;33: 777–790.
- O'Garra, A. et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.* 22, 711–717 (1992).
- Pellegrini, A., Guinazú, N., Aoki, M. P., Calero, I. C., Carrera-Silva, E. A., Girones, N., Fresno, M., & Gea, S. (2007). Spleen B cells from BALB/c are more prone to activation than spleen B cells from C57BL/6 mice during a secondary immune response to cruzipain. *International Immunology*, 19(12), 1395–1402. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm107>

- Perez-Lopez, A., Rosales-Reyes, R., Alpuche-Aranda, C. M., & Ortiz-Navarrete, V. (2013). Salmonella downregulates Nod-like receptor family CARD domain containing protein 4 expression to promote its survival in B cells by preventing inflammasome activation and cell death. *The Journal of Immunology*, 190(3), 1201-1209.
- Roppenser, B., Grinstead, S., & Brumell, J. H. (2012). Modulation of host phosphoinositide metabolism during Salmonella invasion by the type III secreted effector SopB. *Methods in cell biology*, 108, 173-186.
- Rosales-Reyes, R., Alpuche-Aranda, C., De La Luz Ramírez-Aguilar, M., Castro-Eguiluz, A. D., and Ortiz-Navarrete, V.: Survival of Salmonella enterica serovar typhimurium within late endosomal-lysosomal compartments of B lymphocytes is associated with the inability to use the vacuolar alternative major histocompatibility complex class I antigen-processing pathway. *Infection and Immunity* 73, 3937-3944 (2005).
- Rosales-Reyes, R., Alpuche-Aranda, C., Ramírez-Aguilar, M. D. L. L., Castro-Eguiluz, A. D., & Ortiz-Navarrete, V. (2005). Survival of Salmonella enterica serovar Typhimurium within late endosomal-lysosomal compartments of B lymphocytes is associated with the inability to use the vacuolar alternative major histocompatibility complex class I antigen-processing pathway. *Infection and immunity*, 73(7), 3937-3944.
- [Rosales-Reyes, R., Perez-Lopez, A., Sanchez-Gomez, C., Hernandez-Mote, R. R., Castro-Eguiluz, D., Ortiz-Navarrete, V., and Alpuche-Aranda, C. M.: Salmonella infects B cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival. \*Microbial Pathogenesis\* 52, 367-374 \(2012\).](#)
- Rosales-Reyes, R., Pérez-López, A., Sánchez-Gómez, C., Hernández-Mote, R. R., Castro-Eguiluz, D., Ortiz-Navarrete, V., & Alpuche-Aranda, C. M. (2012). Salmonella infects B cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival. *Microbial pathogenesis*, 52(6), 367-374.
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H., ... & Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1890-1893.
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H. & Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1890-1893.
- Santoyo, G. (2008). Recombinación en bacterias: ingeniería del ADN usando recombinación homóloga. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(1-2), 38-47.
- Saraiva, M., & O'garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews immunology*, 10(3), 170-181.
- Schülke, S. (2018). Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Frontiers in immunology*, 9, 455.
- Schülke, S. (2018). Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Frontiers in immunology*, 9, 455.
- Schultz, C., Strunk, T., Temming, P., Matzke, N., & Härtel, C. (2007). Reduced IL-10 production and-receptor expression in neonatal T lymphocytes. *Acta Paediatrica*, 96(8), 1122-1125.
- Shen P., Roch T., Lampropoulou V., et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 2014; 507:366-370.
- Shi, J., Wang, H., Guan, H., Shi, S., Li, Y., Wu, X., ... & Hu, D. (2016). IL10 inhibits starvation-induced autophagy in hypertrophic scar fibroblasts via cross talk between the IL10-IL10R-STAT3 and IL10-AKT-mTOR pathways. *Cell death & disease*, 7(3), e2133-e2133.
- Sindhava, V. J., & Bondada, S. (2012). Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation. *Frontiers in immunology*, 3, 372.
- Sindhava, V., & Bondada, S. (2012). Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation. *Frontiers in immunology*, 3, 372.
- Ulloa, R., Corrales, O., Cabrera-Reyes, F., Jara-Wilde, J., Saez, J. J., Rivas, C., & Diaz-Muñoz, J. (2021). B cells adapt their nuclear morphology to organize the immune synapse and facilitate antigen extraction. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Verma, R., Balakrishnan, L., Sharma, K., Khan, A. A., Advani, J., Gowda, H., ... & Shankar, S. (2016). A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *Journal of cell communication and signaling*, 10(1), 61-67.
- Verma, R., Balakrishnan, L., Sharma, K., Khan, A. A., Advani, J., Gowda, H., ... & Shankar, S. (2016). A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *Journal of cell communication and signaling*, 10(1), 61-67.
- Weber-Nordt, R. M., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Moore, K. W., Darnell, J. E., & Schreiber, R. D. (1996). Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27954-27961.
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Matsushita, T., Tsubata, T., & Tedder, T. F. (2009). The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7459-7472.
- Akdis, C. A., Joss, A., Akdis, M., Faith, A., & Blaser, K. (2000). A molecular basis for T cell suppression by IL-10: CD28-associated IL-10 receptor inhibits CD28 tyrosine phosphorylation and phosphatidylinositol 3-kinase binding. *The FASEB Journal*, 14(12), 1666-1668.
- Aldecoa, F., & Ávila, J. (2021). La vía canónica PI3K/AKT/mTOR y sus alteraciones en cáncer. *Horizonte Médico (Lima)*, 21(4).
- Arai T, Hiromatsu K, Nishimura H, Kimura Y, Kobayashi N, Ishida H, Nimura Y, Yoshikai Y. 1995. Endogenous interleukin 10 prevents apoptosis in macrophages during Salmonella infection. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 213:600-7
- Burmeister, A. R., & Marriott, I. (2018). The interleukin-10 family of cytokines and their role in the CNS. *Frontiers in cellular neuroscience*, 12, 458.
- Cai, G., Nie, X., Zhang, W., Wu, B., Lin, J., Wang, H., ... & Shen, Q. (2012). A regulatory role for IL-10 receptor signaling in development and B cell help of T follicular helper cells in mice. *The Journal of Immunology*, 189(3), 1294-1302.
- Crump J.A., Mintz E.D. (2010) Global trends in typhoid and paratyphoid Fever. *Clin Infect Dis* 50: 241-246.
- De Jong, H. K., Parry, C. M., van der Poll, T., & Wiersinga, W. J. (2012). Host-pathogen interaction in invasive salmonellosis.
- Donnelly, R. P., Sheikh, F., Kotenko, S. V., & Dickensheets, H. (2004). The expanded family of class II cytokines that share the IL-10 receptor-2 (IL-10R2) chain. *Journal of leukocyte biology*, 76(2), 314-321.
- Fung, T. C., Bessman, N. J., Hepworth, M. R., Kumar, N., Shibata, N., Kobuley, D., ... & Sonnenberg, G. F. (2016). Lymphoid-tissue-resident commensal bacteria promote members of the IL-10 cytokine family to establish mutualism. *Immunity*, 44(3), 634-646.

- Garcia-Gil A., Galan-Enriquez C. S., Perez-Lopez A., Nava P., Alpuche-Aranda C., Ortiz-Navarrete V., SopB activates the Akt-YAP pathway to promote Salmonella survival within B cells. *Virulence*. 2018;9: 1390–1402.
- Garcia-Gil, A., Lopez-Bailon, L. U., & Ortiz-Navarrete, V. (2019). Beyond the antibody: B cells as a target for bacterial infection. *Journal of leukocyte biology*, 105(5), 905-913.
- Glocker, E. O., Kotlarz, D., Klein, C., Shah, N., & Grimbacher, B. (2011). IL-10 and IL-10 receptor defects in humans. *Annals of the New York Academy of Sciences*, 1246(1), 102-107.
- Han X, Wang S, Fan Y, Yang J, Jiao L, Qiu H, et al. Chlamydia infection induces ICOS ligand-expressing and IL-10-producing dendritic cells that can inhibit airway inflammation and mucus overproduction elicited by allergen challenge in BALB/c mice. *J Immunol* (2006) 176:5232–9. doi:10.4049/jimmunol.176.9.5232
- Haraga, A., Ohlson, M. B., & Miller, S. I. (2008). Salmonellae interplay with host cells. *Nature Reviews Microbiology*, 6(1), 53-66.
- Heine, G. et al. 1, 25-dihydroxyvitamin D3 promotes IL-10 production in human B cells. *Eur. J. Immunol.* 38, 2210–2218 (2008).
- Ho, A. S., Liu, Y., Khan, T. A., Hsu, D. H., Bazan, J. F., & Moore, K. W. (1993). A receptor for interleukin 10 is related to interferon receptors. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 90(23), 11267-11271.
- Hybiske, K., & Stephens, R. S. (2008). Exit strategies of intracellular pathogens. *Nature Reviews Microbiology*, 6(2), 99-110.
- *IL-10 Cytokine Family Signaling Pathway*. (2014). [www.Rndsystems.Com. https://www.rndsystems.com/pathways/il-10-cytokine-family-signaling-pathway](https://www.rndsystems.com/pathways/il-10-cytokine-family-signaling-pathway)
- Jaslow S. L., Gibbs K. D., Fricke W. F., et al. Salmonella activation of STAT3 signaling by SarA effector promotes intracellular replication and production of IL-10. *Cell Rep*. 2018; 23:3525–3536.
- Jaslow, S. L., Gibbs, K. D., Fricke, W. F., Wang, L., Pittman, K. J., Mammel, M. K., ... & Ko, D. C. (2018). Salmonella activation of STAT3 signaling by SarA effector promotes intracellular replication and production of IL-10. *Cell reports*, 23(12), 3525-3536.
- Jurlander, J., Lai, C. F., Tan, J., Chou, C. C., Geisler, C. H., Schriber, J., ... & Caligiuri, M. A. (1997). Characterization of interleukin-10 receptor expression on B-cell chronic lymphocytic leukemia cells. *Blood, The Journal of the American Society of Hematology*, 89(11), 4146-4152.
- Kidgell, C., Reichard, U., Wain, J., Linz, B., Torpdahl, M., Dougan, G., & Achtman, M. (2002). Salmonella typhi, the causative agent of typhoid fever, is approximately 50,000 years old. *Infection, Genetics and Evolution*, 2(1), 39-45.
- Levine, M. M., Black, R. E., and Lanata, C.: Precise Estimation of the Numbers of Chronic Carriers of Salmonella typhi in Santiago, Chile, an Endemic Area. *The Journal of Infectious Diseases* 146, 724{726 (1982).
- López Bailón Luis Uriel. (2018). Análisis del papel del complejo I del blanco de rapamicina en mamíferos en la infección de linfocitos B murinos por *Salmonella enterica* serovar Typhimurium (Tesis de maestría). Instituto Politécnico Nacional, Escuela Nacional de Ciencias Biológicas. Ciudad de México.
- López-Medina, M., Carrillo-Martín, I., Leyva-Rangel, J., Alpuche-Aranda, C., & Ortiz-Navarrete, V. (2015). Salmonella impairs CD8 T cell response through PD-1: PD-L axis. *Immunobiology*, 220(12), 1369-1380.
- Lopez-Medina, M., Perez-Lopez, A., Alpuche-Aranda, C., & Ortiz-Navarrete, V. (2015). Salmonella induces PD-L1 expression in B cells. *Immunology letters*, 167(2), 131-140.
- Luis, L. B., Ana, G. T., Carlos, G. E., Abraham, G. G., Iris, E. G., Martha, M. L., & Vianney, O. N. (2022). Salmonella Promotes Its Own Survival in B Cells by Inhibiting Autophagy. *Cells*, 11(13), 2061.
- Martín-Orozco, N., Isibasi, A., & Ortiz-Navarrete, V. (2001). Macrophages present exogenous antigens by class I major histocompatibility complex molecules via a secretory pathway as a consequence of interferon- $\gamma$  activation. *Immunology*, 103(1), 41-48.
- Mathur, R., Oh, H., Zhang, D., Park, S. G., Seo, J., Koblansky, A., ... & Ghosh, S. (2012). A mouse model of Salmonella typhi infection. *Cell*, 151(3), 590-602.
- Mittrücker, H. W., & Kaufmann, S. H. (2000). Immune response to infection with Salmonella typhimurium in mice. *Journal of leukocyte biology*, 67(4), 457-463.
- Monack, D. M., Hersh, D., Ghorri, N., Bouley, D., Zychlinsky, A., & Falkow, S. (2000). Salmonella exploits caspase-1 to colonize Peyer's patches in a murine typhoid model. *The Journal of experimental medicine*, 192(2), 249-258.
- Moore, K. W., de Waal Malefyt, R., Coffman, R. L., & O'Garra, A. (2001). Interleukin-10 and the interleukin-10 receptor. *Annual review of immunology*, 19(1), 683-765.
- Neves P., Lampropoulou V., Calderon-Gomez E., et al. Signaling via the MyD88 adaptor protein in B cells suppresses protective immunity during Salmonella Typhimurium infection. *Immunity*. 2010;33: 777–790.
- O'Garra, A. et al. Ly-1 B (B-1) cells are the main source of B cell-derived interleukin 10. *Eur. J. Immunol.* 22, 711–717 (1992).
- Pellegrini, A., Guinazú, N., Aoki, M. P., Calero, I. C., Carrera-Silva, E. A., Girones, N., Fresno, M., & Gea, S. (2007). Spleen B cells from BALB/c are more prone to activation than spleen B cells from C57BL/6 mice during a secondary immune response to cruzipain. *International Immunology*, 19(12), 1395–1402. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxm107>
- Perez-Lopez, A., Rosales-Reyes, R., Alpuche-Aranda, C. M., & Ortiz-Navarrete, V. (2013). Salmonella downregulates Nod-like receptor family CARD domain containing protein 4 expression to promote its survival in B cells by preventing inflammasome activation and cell death. *The Journal of Immunology*, 190(3), 1201-1209.
- Roppenser, B., Grinstein, S., & Brumell, J. H. (2012). Modulation of host phosphoinositide metabolism during Salmonella invasion by the type III secreted effector SopB. *Methods in cell biology*, 108, 173-186.
- Rosales-Reyes, R., Alpuche-Aranda, C., De La Luz Ramírez-Aguilar, M., Castro-Eguiluz, A. D., and Ortiz-Navarrete, V.: Survival of Salmonella enterica serovar typhimurium within late endosomal-lysosomal compartments of B lymphocytes is associated with the inability to use the vacuolar alternative major histocompatibility complex class I antigen-processing pathway. *Infection and Immunity* 73, 3937{3944 (2005).
- Rosales-Reyes, R., Alpuche-Aranda, C., Ramírez-Aguilar, M. D. L. L., Castro-Eguiluz, A. D., & Ortiz-Navarrete, V. (2005). Survival of Salmonella enterica serovar Typhimurium within late endosomal-lysosomal compartments of B lymphocytes is associated with the inability to use the vacuolar alternative major histocompatibility complex class I antigen-processing pathway. *Infection and immunity*, 73(7), 3937-3944.
- [Rosales-Reyes, R., Perez-Lopez, A., Sanchez-Gomez, C., Hernandez-Mote, R. R., Castro-Eguiluz, D., Ortiz-Navarrete, V., and Alpuche-Aranda, C. M.: Salmonella infects B cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival. \*Microbial Pathogenesis\* 52, 367{374 \(2012\).](#)
- Rosales-Reyes, R., Pérez-López, A., Sánchez-Gómez, C., Hernández-Mote, R. R., Castro-Eguiluz, D., Ortiz-Navarrete, V., & Alpuche-Aranda, C. M. (2012). Salmonella infects B cells by macropinocytosis and formation of spacious phagosomes but does not induce pyroptosis in favor of its survival. *Microbial pathogenesis*, 52(6), 367-374.

- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H., ... & Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1890-1893.
- Rousset, F., Garcia, E., Defrance, T., Peronne, C., Vezzio, N., Hsu, D. H. & Banchereau, J. (1992). Interleukin 10 is a potent growth and differentiation factor for activated human B lymphocytes. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 89(5), 1890-1893.
- Santoyo, G. (2008). Recombinería en bacterias: ingeniería del ADN usando recombinación homóloga. *Revista Latinoamericana de Microbiología*, 50(1-2), 38-47.
- Saraiva, M., & O'garra, A. (2010). The regulation of IL-10 production by immune cells. *Nature reviews immunology*, 10(3), 170-181.
- Schülke, S. (2018). Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Frontiers in immunology*, 9, 455.
- Schülke, S. (2018). Induction of interleukin-10 producing dendritic cells as a tool to suppress allergen-specific T helper 2 responses. *Frontiers in immunology*, 9, 455.
- Schultz, C., Strunk, T., Temming, P., Matzke, N., & Härtel, C. (2007). Reduced IL-10 production and-receptor expression in neonatal T lymphocytes. *Acta Paediatrica*, 96(8), 1122-1125.
- Shen P., Roch T., Lampropoulou V., et al. IL-35-producing B cells are critical regulators of immunity during autoimmune and infectious diseases. *Nature*. 2014; 507:366-370.
- Shi, J., Wang, H., Guan, H., Shi, S., Li, Y., Wu, X., ... & Hu, D. (2016). IL10 inhibits starvation-induced autophagy in hypertrophic scar fibroblasts via cross talk between the IL10-IL10R-STAT3 and IL10-AKT-mTOR pathways. *Cell death & disease*, 7(3), e2133-e2133.
- Sindhava, V. J., & Bondada, S. (2012). Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation. *Frontiers in immunology*, 3, 372.
- Sindhava, V., & Bondada, S. (2012). Multiple regulatory mechanisms control B-1 B cell activation. *Frontiers in immunology*, 3, 372.
- Ulloa, R., Corrales, O., Cabrera-Reyes, F., Jara-Wilde, J., Saez, J. J., Rivas, C., & Diaz-Muñoz, J. (2021). B cells adapt their nuclear morphology to organize the immune synapse and facilitate antigen extraction. *Frontiers in Immunology*, 12.
- Verma, R., Balakrishnan, L., Sharma, K., Khan, A. A., Advani, J., Gowda, H., ... & Shankar, S. (2016). A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *Journal of cell communication and signaling*, 10(1), 61-67.
- Verma, R., Balakrishnan, L., Sharma, K., Khan, A. A., Advani, J., Gowda, H., ... & Shankar, S. (2016). A network map of Interleukin-10 signaling pathway. *Journal of cell communication and signaling*, 10(1), 61-67.
- Weber-Nordt, R. M., Riley, J. K., Greenlund, A. C., Moore, K. W., Darnell, J. E., & Schreiber, R. D. (1996). Stat3 recruitment by two distinct ligand-induced, tyrosine-phosphorylated docking sites in the interleukin-10 receptor intracellular domain. *Journal of Biological Chemistry*, 271(44), 27954-27961.
- Yanaba, K., Bouaziz, J. D., Matsushita, T., Tsubata, T., & Tedder, T. F. (2009). The development and function of regulatory B cells expressing IL-10 (B10 cells) requires antigen receptor diversity and TLR signals. *The Journal of Immunology*, 182(12), 7459-7472.